



FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA

LA CALPROTECTINA FECAL EN LA EDAD PEDIÁTRICA:
DETERMINACIÓN DE NIVELES DE NORMALIDAD EN
NIÑOS SANOS Y ANÁLISIS DE FACTORES INFLUYENTES

Tesis doctoral

Madrid, 2019

Marta Velasco Rodríguez-Belvís

**LA CALPROTECTINA FECAL EN LA EDAD PEDIÁTRICA:
DETERMINACIÓN DE NIVELES DE NORMALIDAD EN NIÑOS
SANOS Y ANÁLISIS DE FACTORES INFLUYENTES**

Marta Velasco Rodríguez-Belvis

LUGAR DE PRESENTACIÓN

Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina

DIRECTORES:

Dra. María José Martínez Gómez y Dr. Alberto García Salido

TUTORA:

Dra. Rosa Ana Muñoz Codoceo

TÍTULO A QUE OPTA

Doctor en Medicina

FECHA DE PRESENTACIÓN

Curso 2019/2020

Este trabajo de tesis fue financiado por la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, mediante los fondos recaudados por la cuarta edición de la Carrera “Corre por el Niño” en 2014.



AGRADECIMIENTOS

Gracias a Carmen y a Julia, por poner tanto rigor y mimo en vuestro trabajo y por abrirme las puertas del laboratorio. A los compañeros de los Centros de Salud que ofrecieron su tiempo y su esfuerzo, en especial a Angelina, Yolanda, Carmen, Eva, Roberto, Alberto, Elia y Beatriz. Vuestra sonrisa para atenderme con la sala de espera atiborrada me servía de motor. Sin vosotros no estaría escribiendo estas palabras.

Gracias a Alberto por tus comentarios certeros, por tener siempre a mano la palabra perfecta y la broma necesaria. A Maria José por despertar en mí las ganas de aprender con y de los pacientes. A los dos por dirigir esta tesis.

Gracias a Rosana por haber creído en mí desde el principio, por poner el listón tan alto y a la vez dar tanto. Por tutorizar e impulsar esta tesis con tu sabiduría y optimismo inagotables. A Almudena por compartir taquilla y consejos. A Laura, Elvira, Gloria, Consuelo, Javier, Jorge, Maribel, Chiqui, Montse, Paula y Marisa por lo que he aprendido y sigo aprendiendo con vosotros. A todos por hacerme el camino más fácil.

Gracias a Clara por sentarte a mi lado el primer día en la facultad y no haberte marchado de ahí desde entonces. A Irene por tus consejos templados, por ponerme los pies en la tierra. A las dos por enseñarme tanto de la amistad. Gracias a Mariajo, Pedro, Amalia, Rafa, Alba, Alejandro, Isa, Luis, Vicky y Dani. Me habéis hecho ver que la mejor tarta se hace con fresas de diferente grado de acidez y alguna que otra grosella. Hacéis que Madrid sea casa.

Gracias a mi padre, por transmitirme tus ganas de aprender, por enseñarme que el trabajo hecho con cuidado y con buen humor es menos trabajo. Por escuchar todas mis dudas y alejar mis miedos. Por haber leído cada línea de esta tesis a mi lado. Gracias a mi madre, por contagiarme esa capacidad de disfrutar de todo, por ayudarme en cada mudanza física y en cada mudanza mental. Los cambios contigo asustan menos. A los

dos, por apoyarme siempre. Por haberme dado alas, pero no haber retirado nunca la red. Porque sé que si caigo, estáis para recogerme.

Gracias a Teresa, Manuel, Marta y Eugenia, por vuestra generosidad infinita que nunca olvidaré.

Gracias a Joaquín por acompañarme en este viaje y los que queden por llegar.

A todos por perdonar el tiempo que no os dediqué.

Gracias a los pacientes por exigir y dar tanto. Me recordáis cada día que tengo el trabajo más bonito y más difícil del mundo.

“Education is an admirable thing, but it is well to remember from time to time that
nothing that is worth knowing can be taught.”

Oscar Wilde

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- µg: microgramos
- A1AT: α-1-Antitripsina
- AC: alimentación complementaria
- Ac: anticuerpo
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- Ag: antígeno
- AINE: antiinflamatorio no esteroideo
- APLV: alergia a las proteínas de leche de vaca
- CDEIS: Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity
- CF: calprotectina fecal
- cm: centímetros
- CU: colitis ulcerosa
- EC: enfermedad de Crohn
- ECCO: European Crohn's and Colitis Organization
- ECN: enterocolitis necrotizante
- EI: enfermedad inflamatoria intestinal
- ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- ERGE: enfermedad por reflujo gastroesofágico
- ESPGHAN: European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
- FA: fórmula artificial
- g: gramos
- GALT: Gut-associated Lymphoid Tissue
- HIUNJ: Hospital Infantil Universitario Niño Jesús
- IBP: inhibidores de la bomba de protones
- IC: intervalo de confianza
- IMC: índice de masa corporal (kg/m²)
- Kg: kilogramos

Glosario de términos

- LM: lactancia materna
- mAc: anticuerpo monoclonal
- MgCO_3 : carbonato de magnesio
- MINI-INDEX: Mucosal Inflammation Non-Invasive Index
- MRP (proteína): Myeloid Related Protein
- °C: grados centígrados
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OR: odds ratio, razón de ventajas o razón de productos cruzados
- PCR: proteína C reactiva
- PEG: polietilenglicol
- PLV: proteína de leche de vaca
- RGE: reflujo gastroesofágico
- RIC: rango intercuartil o rango intercuartílico
- RR: riesgo relativo
- S100 (proteína): proteína soluble en sulfato de amino saturado al 100%
- SEGHNPP: Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica
- SES-CD: Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease
- SG: semanas de gestación
- SII: síndrome de intestino irritable
- UCEIS: Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity
- VSG: velocidad de sedimentación globular

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	19
1.1	CALPROTECTINA: HISTORIA Y NOMENCLATURA	21
1.2	ESTRUCTURA MOLECULAR, FUNCIONES Y DISTRIBUCIÓN	22
1.3	LA CALPROTECTINA FECAL	25
1.4	USOS DE LA CF EN MEDICINA	29
1.4.1	ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	29
1.4.2	FIBROSIS QUÍSTICA	33
1.4.3	ALERGIA	34
1.4.4	ENFERMEDAD CELIACA	36
1.4.5	ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE	37
1.4.6	GASTROENTERITIS AGUDA INFECCIOSA	38
1.4.7	ENFERMEDAD POR REFLUJO GASTROESOFÁGICO	38
1.5	FACTORES QUE INFLUYEN EN LOS VALORES DE CF	41
1.5.1	LA EDAD: LA CF EN PEDIATRÍA	41
1.5.2	EL MODO DE NACIMIENTO, LA EDAD GESTACIONAL, EL PESO AL NACIMIENTO	44
1.5.3	LA LACTANCIA	45
1.5.4	LA ANTROPOMETRÍA	45
1.5.5	LA TOMA DE MEDICAMENTOS	46
1.5.6	OTROS	46
1.6	DETERMINACIÓN DE LA CF	48
1.6.1	ENZIMOINMUNOANÁLISIS	48
1.6.2	INMUNOENSAYO DE FLUJO LATERAL	50
1.6.3	INMUNOTURBIDIMETRÍA	53
1.7	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA FECAL A ESTUDIO	55
2	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
2.1	JUSTIFICACIÓN	61
2.2	HIPÓTESIS	62
2.3	OBJETIVOS	62
2.3.1	OBJETIVO PRINCIPAL	62
2.3.2	OBJETIVOS SECUNDARIOS	62

3	MATERIAL Y MÉTODOS	63
3.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	65
3.2	SUJETOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	66
3.2.1	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	66
3.2.2	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	66
3.3	INCLUSIÓN DE SUJETOS	68
3.3.1	RECLUTAMIENTO DE PARTICIPANTES	68
3.3.2	RECOGIDA DE DATOS	68
3.4	RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	70
3.4.1	RECOGIDA DE MUESTRAS	70
3.4.2	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS (LABORATORIO DEL HIUNJ)	70
3.5	CONTROL DE PARTICIPANTES CON CF ELEVADA	74
3.6	VALORACIÓN POR COMITÉS DE ÉTICA	75
3.7	CRONOGRAMA	76
4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	77
4.1	TAMAÑO MUESTRAL	79
4.2	ANÁLISIS DE RESULTADOS	81
5	RESULTADOS	85
5.1	DESCRIPCIÓN DE LOS SUJETOS ESTUDIADOS	87
5.1.1	NÚMERO DE VOLUNTARIOS INCLUIDOS, EDAD Y GÉNERO	87
5.1.2	FACTORES PERINATALES	89
5.1.3	LACTANCIA	89
5.1.4	DATOS ANTROPOMÉTRICOS	90
5.1.5	MEDICACIÓN RECIBIDA ANTES DEL ESTUDIO	90
5.1.6	ASISTENCIA A CENTRO ESCOLAR	91
5.1.7	SUJETOS CON CF ≥ 1000 MCG/G	91
5.2	NIVELES DE CF EN EL CONJUNTO DE LA MUESTRA	93
5.3	NIVELES DE CF POR GRUPOS ETARIOS	97
5.3.1	SUJETOS MENORES DE 1 AÑO	97
5.3.2	SUJETOS MAYORES DE UN AÑO	100
5.4	CORRELACIÓN ENTRE LA EDAD Y EL NIVEL DE CF	104
5.5	CORRELACIÓN ENTRE EL SEXO Y EL NIVEL DE CF	106
5.6	CORRELACIÓN ENTRE LOS FACTORES PERINATALES Y EL NIVEL DE CF	108

5.6.1	LA EDAD GESTACIONAL	108
5.6.2	EL TIPO DE NACIMIENTO	110
5.6.3	EL PESO AL NACIMIENTO	112
5.7	CORRELACIÓN ENTRE EL TIPO DE LACTANCIA Y EL NIVEL DE CF	114
5.7.1	SUBGRUPOS ETARIOS ENTRE LOS LACTANTES MENORES DE 6 MESES	115
5.8	CORRELACIÓN ENTRE LA ANTROPOMETRÍA Y EL NIVEL DE CF	118
5.8.1	EL PESO	118
5.8.2	LA TALLA	119
5.8.3	EL IMC	121
5.9	CORRELACIÓN ENTRE LA MEDICACIÓN RECIBIDA Y EL NIVEL DE CF	124
5.10	CORRELACIÓN ENTRE LA ASISTENCIA A CENTRO ESCOLAR Y EL NIVEL DE CF	128
6	DISCUSIÓN	131
6.1	REPRESENTATIVIDAD DE LA MUESTRA	133
6.2	NIVELES DE CF EN EL CONJUNTO DE LA MUESTRA	135
6.3	NIVELES DE CF POR GRUPOS ETARIOS	139
6.3.1	NEONATOS	139
6.3.2	LACTANTES DE 1 A 11 MESES	141
6.3.3	NIÑOS DE 12 A 23 MESES	142
6.3.4	MAYORES DE 2 AÑOS	143
6.4	CORRELACIÓN ENTRE LA EDAD Y EL NIVEL DE CF	144
6.5	CORRELACIÓN ENTRE SEXO Y EL NIVEL DE CF	149
6.6	CORRELACIÓN ENTRE LOS FACTORES PERINATALES Y EL NIVEL DE CF	150
6.6.1	MODO DE NACIMIENTO	150
6.6.2	LA EDAD GESTACIONAL	152
6.6.3	EL PESO AL NACIMIENTO	154
6.7	CORRELACIÓN ENTRE EL TIPO DE LACTANCIA Y EL NIVEL DE CF	156
6.8	CORRELACIÓN ENTRE LA ANTROPOMETRÍA Y EL NIVEL DE CF	160
6.8.1	EL PESO	161
6.8.2	LA TALLA	161
6.8.3	EL IMC	162
6.9	CORRELACIÓN ENTRE LA MEDICACIÓN RECIBIDA Y EL NIVEL DE CF	166
6.10	CORRELACIÓN ENTRE LA ASISTENCIA A CENTRO ESCOLAR Y EL NIVEL DE CF	168
7	LIMITACIONES	171
8	CONCLUSIONES	175

9	ANEXOS	179
9.1	PARTICIPANTES EXCLUIDOS	181
9.1.1	EXCLUIDOS POR ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA	182
9.1.2	EXCLUIDOS POR HALLAZGO DE DISBACTERIOSIS INTESTINAL	183
9.1.3	EXCLUIDOS POR HALLAZGO DE PARÁSITOS	186
9.1.4	EXCLUIDOS POR HALLAZGO DE COPROCULTIVO POSITIVO	189
9.1.5	EXCLUIDOS POR HALLAZGO DE ADENOVIRUS Y/O ROTAVIRUS	191
9.1.6	EXCLUIDOS POR LA PRESENCIA DE SÍNTOMAS	192
9.1.7	EXCLUIDOS POR LA INGESTA DE FÁRMACOS	193
9.2	APROBACIÓN DE COMITÉS DE ÉTICA	195
9.3	DOCUMENTACIÓN COMPLEMENTARIA DEL ESTUDIO	197
9.4	COMUNICACIÓN DE RESULTADOS	205
9.4.1	PUBLICACIONES	205
9.4.2	COMUNICACIONES EN CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS	217
10	BIBLIOGRAFÍA	225

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CALPROTECTINA: HISTORIA Y NOMENCLATURA

En 1980, Fargehol y colaboradores, de la Universidad de Oslo, buscaban un nuevo biomarcador que permitiese analizar el grado de infiltración y recambio de los leucocitos en los procesos inflamatorios. Los métodos disponibles hasta el momento, como los estudios con granulocitos marcados con isótopos y el análisis histológico de los tejidos inflamados, eran poco aplicables en la práctica clínica. Estos investigadores se plantearon como alternativa estudiar las proteínas que se encontraban aumentadas en el plasma de pacientes con procesos inflamatorios y eran presumiblemente liberadas por los leucocitos. Fue así como aislaron la calprotectina de los granulocitos por primera vez y la nombraron entonces, de forma provisional, "proteína L1"¹. En los siguientes años, distintos autores identificaron otras proteínas con características similares. Se nombraron en función de la localización en la que se descubrió su expresión como "MRP 8" (acrónimo de "myeloid related protein 8") o "MRP 14"; o basándose en sus propiedades como "antígeno relacionado con la fibrosis quística" o "calgranulina" por su capacidad de unir calcio y su expresión en granulocitos. En 1965, Moore comprobó la solubilidad de estas proteínas en sulfato de amonio saturado al 100%, y decidió denominarlas por ello proteínas S100. Así, la "MRP8" o "calgranulina A" pasaba a denominarse "S100A8". De igual forma, la "MRP14" o "calgranulina B" sería desde entonces la "S100A9"².

Fue en 1988 cuando la secuenciación de aminoácidos y de ADN permitió identificar que todas ellas eran una misma proteína, o, para ser más exactos, partes de una misma proteína. En 1990, el grupo de Fargehol, haciendo alusión a su capacidad de unión al calcio (cal) y a su actividad antimicrobiana identificada *in vitro* (protect), propuso el que sería el nombre definitivo para esta molécula, la calprotectina^{3,4}.

1.2 ESTRUCTURA MOLECULAR, FUNCIONES Y DISTRIBUCIÓN

Como se indicó antes, la calprotectina está formada por las proteínas S100A8 (compuesta de 93 aminoácidos y con un peso molecular de 10.8 kDa), y S100A9 (con 114 aminoácidos y un peso de 13.2 kDa). Estas proteínas tienen la capacidad de formar homodímeros (cuando se unen entre sí dos macromoléculas idénticas, como dos unidades de la proteína S100A9), heterómeros (cuando se unen dos diferentes, como S100A8 y S100A9) y otros compuestos con más subunidades. El complejo heterotetramérico (S100A8/A9)₂ constituye la denominada calprotectina^{3,5} tal y como se representa en la Figura 1.

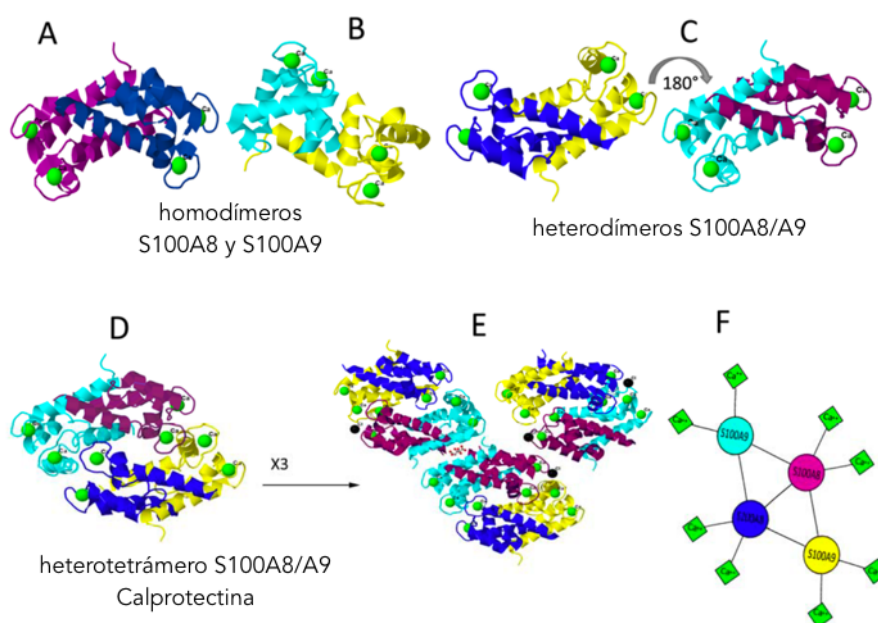


Figura 1: formación de la calprotectina: A. Homodímero de proteína S100A8 (con cada subunidad en azul oscuro y morado respectivamente). B. Homodímero de proteína S100A9 (con cada subunidad en azul claro y amarillo respectivamente). C. Heterodímeros S100A8/A9 mostrados en dos proyecciones rotadas 180°. D. Heterotetrámero calprotectina, formado por los dos heterodímeros del apartado C. E. Dodecámero formado por 3 calprotectinas. F. Representación esquemática de la estructura de la calprotectina con el mismo código de colores que en A y B. Los iones de calcio unidos se muestran como esferas o cuadrados verdes, respectivamente. Adaptado de referencia⁵.

El peso molecular de la calprotectina varía según las referencias consultadas. Los primeros estudios indicaron una masa de 36.5 kDa, dato que aún aparece en muchas publicaciones, y que se refiere al peso del complejo formado por una proteína S100A8 y dos S100A9^{3,6,7}. También se acepta la cifra de 24 kDa como resultado de la unión de una unidad de S100A8 y una unidad de S100A9, y 48 kDa como el peso molecular del tetrámero (S100A8/A9)₂ completo^{8,9}.

La calprotectina constituye entre el 30 y 60% de las proteínas presentes en el citosol de los neutrófilos y el 5% del total de las proteínas de estas células⁹. Su secuencia genética está en el cromosoma humano 1q21 y se expresa durante el periodo de diferenciación mieloide⁶.

También está presente, aunque en menor proporción, en otras células sanguíneas como monocitos, macrófagos y plaquetas, así como en queratinocitos, células epiteliales y células pancreáticas. Por ello se encuentra en tejidos como la piel, pulmones, tracto gastrointestinal, mucosa oral y mucosa del cérvix uterino; y en múltiples fluidos: suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, saliva, orina, líquido sinovial y heces^{8,10}.

La calprotectina es una proteína fijadora de calcio, zinc y manganeso, lo que define algunas de sus características. Es resistente al calor y a la proteólisis, sobre todo en presencia de calcio. Sus propiedades bacteriostáticas y fungiestáticas dependen de su habilidad para unir manganeso y zinc⁹. Incluso la propia conformación de la proteína, y su capacidad de formar el heterodímero S100A8/A9 o los tetrámeros (S100A8/A9)₂ se ve influenciada por la unión a calcio y/o zinc. De hecho, algunos estudios realizados mediante espectrometría de masa indican que la presencia de calcio y/o zinc sería imprescindible para la formación de estos últimos⁸.

Se atribuyen múltiples funciones biológicas a la calprotectina. Forma parte de la estructura del citoesqueleto y es marcador de la diferenciación de las células

mielomonocíticas^{5,11}. Además, interviene en la traducción de señales intracelulares, estimula la producción de inmunoglobulinas, tiene una función quimiotáctica, regula la reacción inflamatoria, la actividad bacteriostática y fungicida y el efecto citotóxico induciendo la apoptosis como antiproliferativo^{6, 9,12}.

Durante el proceso inflamatorio, la calprotectina cumple funciones intra y extracelulares. La liberación al espacio extracelular se produce mediante secreción activa dependiente de energía tras la activación de la proteína kinasa C y por liberación pasiva desde las células necróticas tras el daño tisular. Los niveles de calprotectina se elevan entre 5 y 40 veces durante los procesos infecciosos o inflamatorios y se correlacionan con el aumento de neutrófilos en sangre y otros reactantes de fase aguda serológicos como la proteína C reactiva (PCR) y la velocidad de sedimentación globular (VSG)^{9,13,14}.

1.3 LA CALPROTECTINA FECAL

La concentración de calprotectina en heces (calprotectina fecal, CF) es muy superior a la plasmática (unas 6 veces) y su presencia puede interpretarse como directamente proporcional a la migración de neutrófilos hacia el tracto gastrointestinal¹⁴⁻¹⁹. En la Figura 2 se representa el aflujo de neutrófilos activados que contienen CF durante el proceso de inflamación intestinal. Se ha demostrado una correlación entre los niveles de CF y la excreción leucocitaria cuantificada mediante leucocitos marcados con indio-111 en los procesos en los que éstos aumentan en heces, como las infecciones o los brotes de enfermedad inflamatoria intestinal (EII)¹⁷⁻²¹.

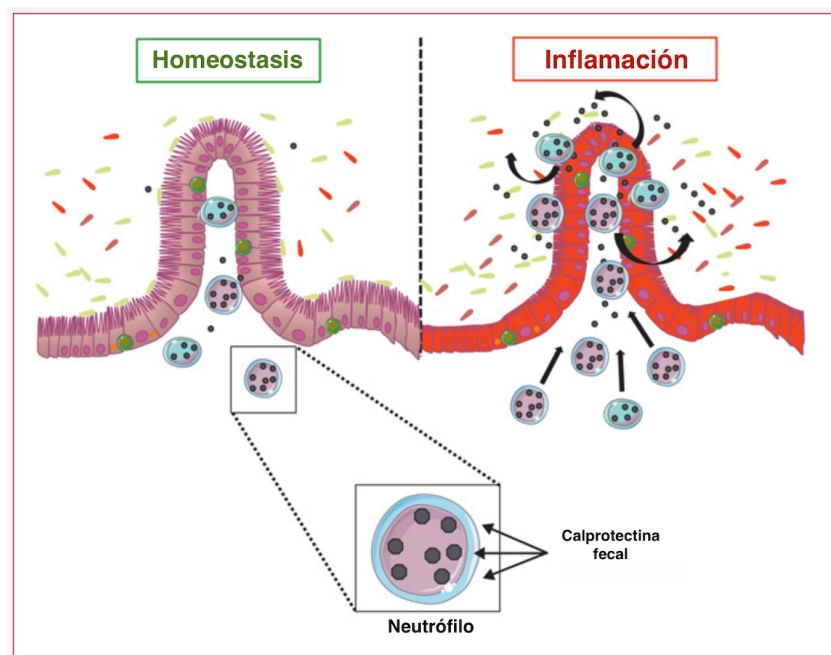


Figura 2: aflujo de neutrófilos activados que contienen CF durante el proceso de inflamación intestinal. Adaptado de referencia²².

Durante el proceso de inflamación intestinal, se produce una respuesta a distintos factores patógenos que activa la llegada de células del sistema inmune innato (granulocitos, monocitos y macrófagos) y células del sistema inmune adaptativo (células T), como se muestra en la Figura 3. Todas ellas segregan factores mediadores de inflamación o liberan proteínas mediante la degradación celular. La calprotectina o (S100A8/A9)² proviene fundamentalmente del citosol de los granulocitos pero los monocitos y las células epiteliales intestinales también pueden aumentar la expresión y secreción de calprotectina tras activarse en respuesta a los factores inflamatorios.

Además, la propia calprotectina puede interactuar con los receptores tipo toll 4 ("toll-like receptor 4" o TLR4) presentes en la membrana de macrófagos y células epiteliales. Estos receptores tienen la capacidad de reconocer una amplia variedad de moléculas cumpliendo el papel de reconocedores de señales de peligro tanto exógenas como endógenas. La activación de los TLR4 de macrófagos y células epiteliales aumenta la expresión de varias moléculas de adhesión. A su vez, el TLR4 se activa en los neutrófilos, lo que amplifica la inflamación a través de la liberación de citocinas, y más calprotectina^{12,24-26}. Todo este proceso conduce a la transmigración de neutrófilos y al daño de la mucosa.

Al mismo tiempo, las células del sistema inmune innato y adaptativo implicadas liberan además de la calprotectina otros factores mediadores de inflamación. La S100A12 proviene principalmente del citosol de los neutrófilos. La lactoferrina, la elastasa polimorfonuclear (PMN) y la mieloperoxidasa (MPO) son derivados de los gránulos de estas células y también tienen propiedades antimicrobianas²³⁻²⁵. En la respuesta inflamatoria, estas proteínas liberadas en la lámina propia atraviesan la mucosa hasta la luz intestinal. Además, existen otras moléculas involucradas en la respuesta innata que se encuentran en el epitelio y en la mucosa colónica, entre las que destacan las defensinas. En el proceso de inflamación intestinal, estas se liberan también hacia la luz²⁶. Las heces, al estar en contacto directo con la mucosa, contienen todas estas proteínas, por lo que su detección en cifras elevadas parece indicar la presencia de inflamación intestinal^{16, 18, 23,27,28}.

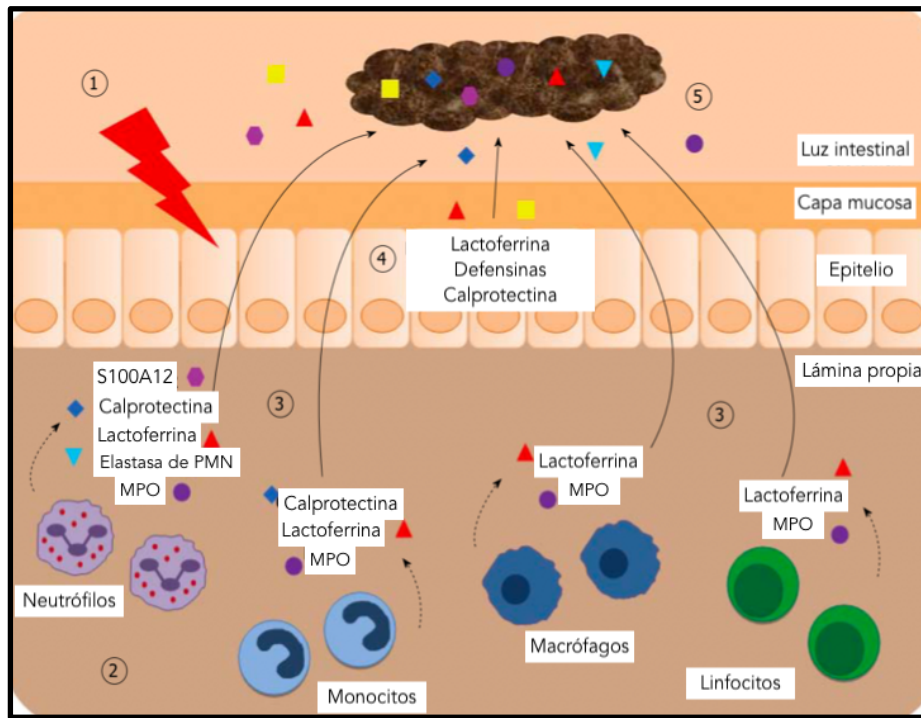


Figura 3: marcadores fecales de inflamación intestinal. 1. Determinados factores desencadenantes afectan al epitelio y activan el sistema inmune intestinal. 2. La respuesta implica la llegada de células del sistema inmune innatas (granulocitos, monocitos y macrófagos) así como células del sistema inmune adaptativo (células T). Todas ellas segregan factores mediadores de inflamación o liberan proteínas mediante la degradación celular. La calprotectina y la S100A12 provienen del citosol de los neutrófilos. La lactoferrina, la elastasa de polimorfonucleares (PMN) y la mieloperoxidasa (MPO) son derivados de los gránulos de estas células y tienen propiedades antimicrobianas. 3. En las fases iniciales de la inflamación intestinal, estas proteínas liberadas atraviesan la mucosa hasta la luz intestinal. 4. Algunos de estos factores (incluyendo las defensinas) también se liberan directamente desde el epitelio y desde la mucosa. 5. Las heces, al estar en contacto directo con la mucosa, contienen estas proteínas. Adaptado de referencia²⁶.

Entre los otros biomarcadores usados en los procesos intestinales, cabe destacar por sus peculiaridades la α -1-Antitripsina (A1AT). Es un inhibidor de proteasa sérico altamente resistente a la proteólisis intestinal que se excreta intacto en las heces. Por ello, es el marcador fecal clásico para las enteropatías perdedoras de proteínas³¹⁻³³. En los procesos de inflamación intestinal que tienen como resultado un daño de la mucosa y el consecuente aumento de la permeabilidad, la extravasación de A1AT hacia la luz del intestino se puede medir en las heces. De hecho, algunos estudios han encontrado

una elevación en pacientes con EII respecto a controles, por lo que se ha considerado su utilidad como marcador en estos procesos^{14, 18,34,35}.

Sin embargo, la correlación hallada entre la excreción de leucocitos marcados con indio-111 y la CF no se ha encontrado con la A1AT fecal. Además, a diferencia de la CF, tampoco se relaciona con el índice de actividad, con la extensión ni la localización de la inflamación^{34,36,37}. Por otra parte, en sujetos con inflamación intestinal no diagnosticados de EII se encuentra una correlación de la CF con la lactoferrina fecal, pero no con la A1AT³⁸. Estos hallazgos hacen pensar que la pérdida de proteínas expresada por este biomarcador no depende únicamente de la inflamación intestinal, y sugieren que la CF mide inflamación más que permeabilidad intestinal.

En base a lo expuesto, el estudio de la CF como marcador de inflamación intestinal, y su comparación con otros indicadores en estos procesos ha suscitado gran interés, permitiendo en las últimas décadas un mejor conocimiento de su significado e interpretación.

1.4 USOS DE LA CF EN MEDICINA

Se han estudiado múltiples usos de la CF, principalmente como marcador de inflamación intestinal, dada su aparente especificidad. Así, se eleva ante una inflamación de la mucosa del intestino de carácter local e insuficiente como para condicionar también un aumento de PCR y VSG y no parece verse afectada por cuadros extra intestinales que pueden aumentar dichos reactantes de fase aguda séricos^{17,41,42}. Por ello, se ha estudiado con especial interés en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), tanto en la enfermedad de Crohn (EC) como en la colitis ulcerosa (UC) y en la EII no clasificada (EII-nc). También se ha objetivado su alteración en otros procesos gastrointestinales, lo que hace plantear su papel en el diagnóstico y seguimiento de estos³⁹⁻⁵¹.

1.4.1 ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La CF ha demostrado su utilidad en el diagnóstico de la EII, pudiendo diferenciar este cuadro de otros funcionales como el síndrome de intestino irritable (SII), en el que presenta niveles muy inferiores^{12,39,52}. Trabajos como el de Choi *et al.* encuentran cifras de CF superiores en niños con SII frente a sanos. Esto podría apoyar la hipótesis de que en este cuadro, cuya fisiopatología aún no está claramente establecida, se produzca una inflamación intestinal de bajo grado⁵³. De cualquier modo, los niveles siguen siendo inferiores a los encontrados en pacientes con EII. La sensibilidad y especificidad de la CF para distinguir entre EII y SII varían entre el 63 y el 100% y el 79 y 93% respectivamente en función de las referencias consultadas, con valores predictivos negativos que alcanzan en algunas series el 100%^{54,55}. De hecho, en pacientes con EII

(tanto adultos como niños), niveles elevados de CF han demostrado una buena correlación con el diagnóstico macroscópico e histológico de colitis^{17,56-60}.

Sin embargo, el punto de corte de CF óptimo para detectar inflamación intestinal no está claramente definido. Se han publicado varios trabajos diseñados para determinar el umbral que permita distinguir a los pacientes con EII de otros con cuadros funcionales. La comparación de estas publicaciones resulta difícil por los distintos criterios de inclusión, edades de los pacientes y pruebas utilizadas. Desde la aparición de las nuevas técnicas de determinación que ofrecen los resultados en $\mu\text{g/g}$, se sugiere un límite superior de la normalidad para adultos de 50 $\mu\text{g/g}$ ^{7, 16, 19, 59,61}.

A este respecto es necesario destacar el trabajo de varios autores. En el metaanálisis de Von Roon *et al.* publicado en 2007 se demostró una mejor precisión a un nivel de corte de 100 $\mu\text{g/g}$ para discriminar a los pacientes con EII⁶². La revisión de Gisbert *et al.* en 2009, que incluyó un total de 2.475 pacientes (niños y adultos), con estudios con puntos de corte variables entre 18.6 y 150 $\mu\text{g/g}$, determinó una sensibilidad del 83% y una especificidad del 84% para diferenciar enfermedad orgánica de funcional¹⁶. Henderson *et al.* publicaron en 2014 un metaanálisis que revisaba la precisión diagnóstica de la CF para la EII pediátrica, incluyendo 8 estudios (6 prospectivos y 2 retrospectivos de casos y controles) con datos de 715 participantes (394 con EII y 321 controles). Tomando como puntos de corte tanto 50 como 100 $\mu\text{g/g}$, la sensibilidad y la especificidad para el diagnóstico fueron 98% (IC 95%, 94.7-99.6%) y 68% (IC del 95%, 50.2-86.3%), respectivamente⁶³. El metaanálisis publicado por Holtman *et al.* en 2016 analizaba los marcadores no invasivos de EII en población pediátrica. Se incluyeron 10 estudios sobre CF con un rango de punto de corte de 50 a 100 $\mu\text{g/g}$ y sensibilidades superiores al 86%. En global, la CF mostró una sensibilidad del 99%, y una especificidad del 65%⁶⁴⁻⁶⁷. Heida *et al.* publicaron en 2018 un estudio prospectivo con 339 pacientes entre 6 y 17 años estudiados por sospecha de EII. En su muestra, el punto de corte de 50 $\mu\text{g/g}$ mostró una sensibilidad del 99% y una especificidad del 71%. Al aplicar el punto de corte de 400 $\mu\text{g/g}$, basado en la curva de ROC, la sensibilidad se mantenía en el 99% pero la especificidad aumentaba hasta el

98%. Los autores concluyen que los marcadores fecales como la CF son especialmente útiles para distinguir EII de SII en niños sin datos clínicos de alarma como rectorragia o enfermedad perianal⁶⁸. Señalan además la relevancia de la denominada “two-threshold strategy” (o estrategia de dos puntos de corte) que ya proponían publicaciones previas. Este enfoque considera el límite de 50 µg/g para la normalidad y otro superior (variable según autores, entre 250 y 400 µg/g) que implicaría la necesidad de evaluación endoscópica⁶⁸⁻⁷⁰. Quedaría así una zona gris (entre 50 µg/g y el segundo límite) en la que deben considerarse otros datos clínicos (signos de alarma o impacto en las actividades habituales) para indicar una evaluación invasiva o una actitud expectante con seguimiento. Además, serían necesarios nuevos estudios que establecieran límites concretos en cada rango etario para poder optimizar esta estrategia. Dilillo *et al.* encontraron que la combinación de la CF con la valoración del aumento de grosor intestinal mediante ecografía era útil para decidir la indicación de pruebas invasivas en niños con síntomas gastrointestinales leves⁷¹. Sin embargo, la baja reproducibilidad de la ecografía y su menor exactitud cuando es realizada por radiólogos no expertos supone una limitación para este enfoque.

Yang *et al.* concluyeron que el análisis de la CF como cribado en pacientes con sospecha de EII resultaba además coste-efectivo frente a la valoración directa por endoscopia, para una probabilidad de EII pre-test $\leq 75\%$ en adultos y $\leq 65\%$ en niños. En su estudio, el punto de corte de 50 µg/g redujo el riesgo de falsos negativos y el retraso diagnóstico frente al de 100 µg/g, sin suponer un aumento sustancial del coste total⁷². Zhang *et al.* compararon la determinación de CF (con un punto de corte de 100 µg/g) con el análisis sanguíneo para los pacientes con sospecha de EII, llegando también a la conclusión de que se trataba de una estrategia coste-efectiva que además reducía el retraso diagnóstico⁷³.

Se ha estudiado también el posible papel de la calprotectina sérica como biomarcador complementario a la CF en la EII. No obstante, su elevación parece reflejar procesos de inflamación sistémica más que intestinal, lo que sugiere escasa utilidad en esta enfermedad^{14,75,76}.

En los pacientes ya diagnosticados de EII, la CF tiene interés en el seguimiento, ya que puede detectar la presencia de inflamación con mejor correlación que los índices de actividad clínica. Por ello resulta de especial utilidad para la detección de actividad residual o de un brote de forma precoz, incluso en pacientes presumiblemente estables⁵⁵. En la EC, ha demostrado una buena correlación con el SES-CD (puntuación de la actividad endoscópica simplificada para la EC, acrónimo de “Simple Endoscopic Score for Crohn’s Disease”) y con el CDEIS (acrónimo de “Crohn’s Disease Endoscopic Index of Severity”)⁷⁴⁻⁷⁷. En algunos estudios superó en este aspecto a la PCR o a la leucocitosis y es el único de los biomarcadores que consiguió discriminar la ausencia de inflamación frente a la actividad leve, moderada y alta, lo que remarca su utilidad en la monitorización de la enfermedad⁷⁸. En la CU, los niveles de CF se han correlacionado también con los índices de actividad clínica e incluso endoscópica como el UCEIS (acrónimo de “Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity”), con el Mayo Score y con los biomarcadores serológicos, mostrando capacidad de predecir la curación mucosa^{74,75,79-81}.

La CF ha demostrado tener valor pronóstico, con utilidad para identificar pacientes con mayor probabilidad de presentar una recidiva de la enfermedad y predecir la respuesta a fármacos o la recurrencia postquirúrgica. Esta función predictiva parece ser más útil en la CU y en la EC con afectación colónica y extenderse a los 3 meses siguientes a la determinación⁸²⁻⁸⁷.

El papel de la CF en la toma de decisiones terapéuticas con los pacientes con EII tiene cada vez mayor peso, aunque algunas de sus limitaciones impedían su uso como resultado primario en los estudios clínicos y como objetivo del tratamiento⁸⁸⁻⁹⁰. En las guías ECCO-ESPGHAN (“European Crohn’s and Colitis Organization” y “European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition”) de 2014 para el manejo de la EC pediátrica, la CF se mencionaba como biomarcador útil en la monitorización para detectar resolución o recurrencia de la inflamación intestinal. Sin embargo, se apuntaba que el valor de corte que debe indicar un cambio en el tratamiento seguía siendo indefinido⁹¹.

Las guías ECCO-ESPGHAN de 2018 para la CU pediátrica incorporan la normalización de la CF como uno de los objetivos terapéuticos a considerar en el seguimiento. De hecho, se recomienda su monitorización en los pacientes en remisión clínica para verificar la curación mucosa y seleccionar aquellos que requieran valoración endoscópica. Se sugiere un umbral de $>250 \mu\text{g/g}$ para predecir inflamación de la mucosa, aunque los autores recomiendan individualizar en cada paciente el valor de CF con el que se debe indicar la realización de colonoscopia⁹².

El gran potencial de la CF como biomarcador en la EIJ justifica la actual búsqueda de estrategias para mejorar su precisión. Turner *et al.* desarrollaron en 2017 el MINI-INDEX (acrónimo de "Mucosal Inflammation Non-Invasive Index"), como un nuevo índice clínico-analítico para pacientes pediátricos con EC. Incluye entre sus parámetros la CF y ha demostrado una alta correlación con la actividad endoscópica evaluada por SES-CD. El MINI-INDEX ha sido recientemente validado en un estudio multicéntrico en el que muestra, con puntuaciones inferiores a 8, una sensibilidad del 84% y una especificidad del 87% para identificar curación mucosa. El beneficio adicional del MINI-INDEX sobre la medición de CF fue pequeño pero significativo, especialmente en pacientes con concentraciones de CF de 100 a $599 \mu\text{g/g}$ ^{90,93}.

1.4.2 FIBROSIS QUÍSTICA

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad multisistémica causada por mutaciones en el gen regulador de conductancia (CFTR), que ocasiona una disminución de las secreciones que afecta principalmente al tracto respiratorio y al gastrointestinal. El daño gastrointestinal condiciona el progreso de la enfermedad, el desarrollo de complicaciones y empeora el estado nutricional.

Entre el 85 y el 90% de los pacientes con FQ tienen insuficiencia pancreática y malabsorción, que suele tratarse con terapia de reemplazo de enzimas pancreáticas. Sin embargo, tanto los pacientes con FQ con adecuada función del páncreas, como

aquellos con insuficiencia pancreática que reciben un tratamiento adecuado pueden tener síntomas abdominales persistentes. Por ello, se ha sugerido la posible contribución de otros factores no pancreáticos, y se ha intentado demostrar la presencia de una enteropatía asociada a este cuadro⁹⁴⁻⁹⁷.

Así, se ha objetivado una elevación de la CF en un 66-93% de los pacientes con FQ, con una correlación negativa con el FEV1 y positiva con la insuficiencia pancreática exocrina. Además, se han observado lesiones de la mucosa de yeyuno e íleon mediante cápsula endoscópica como disminución de las vellosidades, edema, eritema, erosiones o úlceras en más de la mitad de los pacientes, y con mayor frecuencia en los que tienen insuficiencia pancreática^{94,97-103}. Schnapp *et al.* demostraron un aumento de los niveles de CF en pacientes con exacerbaciones respiratorias, que disminuían tras el tratamiento antibiótico adecuado¹⁰⁴. Además, Enaud *et al.* encontraron en los pacientes con FQ e inflamación intestinal un patrón de microbiota similar al descrito en pacientes con EI¹⁰⁵.

Esto sugiere la presencia de enteropatía e inflamación intestinal en pacientes con FQ, así como una posible correlación inversa entre la CF y la función pulmonar. Sin embargo, el mecanismo patogénico de esta enteropatía asociada a la FQ está aún por dilucidar. Probablemente se deba a una combinación de factores, como el aumento de la permeabilidad con el consecuente paso de agentes agresores desde la luz intestinal, los daños de la mucosa secundarios a la alteración del transporte de cloro o por los tratamientos farmacológicos y la posible alteración de la microbiota^{95, 97, 100,101,105}.

1.4.3 ALERGIA

El término “alergia” engloba a las reacciones adversas frente a determinadas sustancias externas en las que se comprueba la implicación del sistema inmune, o al menos se tiene una alta sospecha de esta. Así, la alergia alimentaria se define como una respuesta inapropiada del sistema inmune que ocurre de manera reproducible tras la exposición a un alimento^{106,107}. Esta puede ser mediada por IgE, no mediada por IgE

o de naturaleza mixta frente a una de las proteínas presentes en el alimento responsable. La primera suele manifestarse con síntomas cutáneos y respiratorios a los minutos-horas de ingerir el alimento implicado. Se diagnostica con la historia clínica y la determinación de IgE específica o una prueba cutánea. La alergia no mediada por IgE suele causar síntomas digestivos que en ocasiones se presentan distanciados temporalmente del contacto con el alimento sospechoso. En este grupo de pacientes, una historia clínica detallada –incluyendo exploración física, valoración nutricional e historia dietética– es clave para establecer la sospecha diagnóstica. Se confirma con la eliminación del alimento sospechoso para comprobar la resolución de los síntomas y la provocación que confirme su reaparición. Por último, las alergias de naturaleza mixta pueden presentar características de ambas^{106–108}.

Partiendo de la hipótesis de la relación entre la microbiota intestinal, la inflamación gastrointestinal y el desarrollo de enfermedades inmuno-mediadas como las alergias, se ha estudiado el posible papel de la CF en estos cuadros. La alergia a la proteína de leche de vaca (APLV), por ser la de mayor prevalencia, es el tipo más estudiado, especialmente la no mediada por IgE, ya que la afectación gastrointestinal es más común y la ausencia de biomarcadores útiles dificulta su diagnóstico.

Se ha objetivado un aumento de la CF en pacientes con APLV no mediada por IgE frente a controles sanos, además de su disminución tras la exclusión de la PLV, y ambas diferencias fueron estadísticamente significativas^{109–112}. Sin embargo, los niveles de CF siguen siendo superiores en pacientes con APLV con dieta de exclusión frente a los sanos, indicando la posible persistencia de cierto grado de inflamación, probablemente relacionado con el aumento de la permeabilidad intestinal característico en estos cuadros^{112–114}. Sorprendentemente, en estos pacientes no se objetivó un ascenso significativo de CF tras la provocación con PLV, lo que plantea la necesidad de más estudios en esta dirección¹¹⁴. Se ha descrito que cifras de CF inferiores a 138 µg/g podrían ser útiles para descartar el diagnóstico de APLV no mediada por IgE, pero no parece un buen test para predecir la respuesta clínica a la exclusión de lácteos^{111,115}. No obstante, los datos de los que se dispone en la actualidad

proviene de estudios de series pequeñas, y en algunos de ellos no se llega a efectuar un diagnóstico de certeza mediante prueba de provocación, por lo que los resultados obtenidos deben ser analizados con cautela.

En resumen, la CF no ha demostrado tener sensibilidad ni especificidad suficientes para el diagnóstico de la APLV no mediada por IgE ni para predecir la respuesta clínica a la exclusión de PLV. Tampoco se recomienda su uso en la prueba de tolerancia oral o en el seguimiento tras el inicio de la dieta^{106-108,115}.

Respecto a otros tipos de alergia o rasgos de atopia, se ha observado una elevación de CF en niños con edades medias de 8 y 9 años con dermatitis atópica grave, que presentaban además eosinofilia y elevación de IgE total. Además, se ha sugerido que la presencia de CF >517 µg/g a los 2 meses de edad pronosticaba la aparición de asma y dermatitis atópica a la edad de 6 años^{116,117}.

En conclusión, se requieren estudios adicionales específicamente diseñados para determinar si la CF es útil en las alergias alimentarias o de otro tipo y en ese caso establecer los valores de corte, aunque probablemente dependerán de la edad, la duración de la dieta de eliminación y otros factores intercurrentes^{106, 111,118}.

1.4.4 ENFERMEDAD CELIACA

La enfermedad celiaca es una enteropatía autoinmune provocada por la intolerancia a los péptidos derivados del gluten presentes en el trigo, el centeno y la cebada, en la que los factores genéticos y ambientales juegan un papel importante. Tras el contacto repetido con el gluten, se produce una lesión en el intestino delgado superior caracterizada por atrofia de las vellosidades, hiperplasia de células de las criptas, lámina propia e infiltración del epitelio con linfocitos, macrófagos y plasma.

En la patogénesis se implica una respuesta inmune a la gliadina mediada por células T en la lámina propia del intestino delgado. Estos linfocitos activan a su vez a

otros linfocitos para generar citoquinas, con lo que se perpetúa la inflamación^{45,46,119,120}. En pacientes tanto adultos como pediátricos con enfermedad celiaca, se ha observado la infiltración de neutrófilos en varias localizaciones de la mucosa intestinal, que disminuía tras la exclusión de gluten¹²¹. Además, la provocación con gluten aumentaba el número de neutrófilos en las biopsias de mucosa rectal de pacientes ya diagnosticados¹¹⁹. Por ello se ha estudiado el posible papel de la CF para detectar o monitorizar esta enteropatía.

Carroccio *et al.* encontraron una CF elevada (>50 µg/g) en el 50% de los adultos y el 46% de los niños con enfermedad celiaca³⁹. Otros estudios han objetivado que los niños con enfermedad celiaca no tratada tenían valores de CF significativamente más altos que los controles. Además, estos valores se relacionaban con el grado de afectación histológica y se reducían después de la dieta de exclusión de gluten, por lo que se ha propuesto la CF como marcador de cumplimiento de la dieta^{40,44-46}. Sin embargo, algunos autores no detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes adultos con enfermedad celiaca y los controles, y no encontraron correlación entre la concentración de CF y la gravedad histológica de las lesiones^{122,123}.

Por todo ello, en este momento la CF no se considera una herramienta útil en el diagnóstico o el manejo de los pacientes con enfermedad celiaca^{4,120}, aunque nuevos estudios podrían dilucidar su posible papel en este cuadro.

1.4.5 ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE

La enterocolitis necrotizante (ECN) afecta a los recién nacidos prematuros y es una de las principales causas de muerte entre los pacientes de las unidades de cuidados intensivos neonatales, con una tasa de mortalidad del 15-40%^{41,43}. Supone además una de las causas más comunes del síndrome del intestino corto, que conlleva una dependencia de la nutrición parenteral a largo plazo. El diagnóstico de ECN se basa en la sospecha clínica, y su precocidad es crítica para mejorar el pronóstico. El nivel de CF

superior a 792 µg/g ha demostrado tener una sensibilidad del 76% y una especificidad del 92% para el diagnóstico de ECN, pero la ausencia de valores de referencia de normalidad en este grupo de edad dificulta la generalización de su uso como biomarcador^{41,48-51}. Además, el tiempo de obtención de resultados con las pruebas clásicas supone una limitación importante para su uso en este cuadro, por lo que se ha propuesto para este fin el uso de pruebas rápidas como el inmunoensayo de flujo lateral^{42,43}.

1.4.6 GASTROENTERITIS AGUDA INFECCIOSA

La diarrea infecciosa sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, especialmente en los medios de menos recursos. Hay innumerables microorganismos (parásitos, virus y bacterias) que pueden causar infecciones gastrointestinales. Pueden ser adquiridos a través del agua o alimentos contaminados, por contacto persona-persona o por otros medios, e incluso ser consecuencia de una disbiosis secundaria a un tratamiento antibiótico.

La identificación del microorganismo causante puede ser un proceso difícil, costoso y lento. Además, otras causas de inflamación intestinal no infecciosa como la EII pueden cursar con síntomas muy similares. Por ello, disponer de un biomarcador que permitiese diferenciar los cuadros infecciosos de los no infecciosos sería de gran utilidad en la práctica clínica.

La CF se eleva en estos procesos, y en algunos trabajos en niños se objetiva que esta elevación es mayor en infecciones bacterianas frente a las virales^{47,124-127}. No obstante, esta prueba no se considera lo suficientemente consistente para su aplicabilidad en la práctica habitual.

1.4.7 ENFERMEDAD POR REFLUJO GASTROESOFÁGICO

El paso retrógrado y sin esfuerzo del contenido gástrico a la boca, conocido como regurgitación o reflujo gastroesofágico (RGE), es habitualmente un fenómeno fisiológico. Sin embargo, cuando se produce con una frecuencia e intensidad suficientes como para superar la capacidad defensiva de la mucosa esofágica y provocar síntomas y/o repercusiones clínicas como la esofagitis, ha de definirse como una Enfermedad por Reflujo Gastroesofágico (ERGE). Algunos estudios han analizado el papel de la CF como marcador de inflamación de la mucosa del tracto gastrointestinal superior en esta enfermedad¹²⁸. Por ejemplo, Berni Canani *et al.* estudiaron a 281 niños con diferentes trastornos gastrointestinales e incluyeron a 17 pacientes con ERGE. La mediana de CF fue de 138 µg/g en el grupo de afectados por ERGE en comparación con una mediana de 28 µg/g en el grupo control ($p < 0.001$)⁴⁴. Además, la toma de inhibidores de la bomba de protones (IBP), que se prescriben con frecuencia para el tratamiento de este proceso, también se ha relacionado con una elevación de la CF. Lundgren *et al.* encontraron en 590 pacientes referidos para realización de colonoscopia que la toma de IBPs se asociaba a niveles superiores de CF¹²⁹. De hecho, en el trabajo de Poullis *et al.*, este efecto fue independiente de la dispepsia por la cual fueron prescritos¹³⁰.

En resumen, la CF tiene muchas de las cualidades que definen al biomarcador óptimo: participa en la patogenia de la enfermedad a estudio, asocia una relevancia clínica, se ve modificado por el tratamiento y es fácilmente determinable y repetible en diversos contextos clínicos¹³¹. Además, la obtención de la muestra a estudio no es invasiva, lo que es especialmente importante en el contexto pediátrico, y es muy estable, pues puede mantenerse hasta una semana a temperatura ambiente. Así mismo, es capaz de identificar a los individuos en riesgo de sufrir un proceso que curse con inflamación intestinal. Por último, en pacientes ya diagnosticados de procesos inflamatorios intestinales permite monitorizar su grado de actividad y respuesta al tratamiento, y aporta un valor pronóstico en cuanto al brote o recurrencia de la enfermedad.

Sin embargo, a pesar de permitir distinguir entre inflamación limitada al intestino e inflamación extra-intestinal, no cumple el requisito de especificidad para una enfermedad, que sería imprescindible para alcanzar la categoría de "biomarcador ideal"^{17,42}. Además, pueden verse afectada por otras variables como se verá en el siguiente apartado.

1.5 FACTORES QUE INFLUYEN EN LOS VALORES DE CF

La utilidad de la calprotectina como biomarcador de inflamación muestra como carencia fundamental su baja especificidad. Puede elevarse tanto en procesos crónicos (como la enfermedad celiaca y fibrosis quística) como agudos (gastroenteritis infecciosa)³⁹⁻⁵¹. Por ello, para aumentar la precisión diagnóstica en los procesos colónicos que cursan con inflamación, se recomienda combinar la determinación de esta proteína con otros reactantes de fase aguda^{90, 92,93,133}.

Además, la CF puede verse afectada por otros factores relacionados con la alimentación, el medio social en el que vive el sujeto, la antropometría, la toma de medicamentos y muy especialmente la edad.

1.5.1 LA EDAD: LA CF EN PEDIATRÍA

Algunas de las características de la CF, como la obtención de la muestra de forma no invasiva, hacen que su uso como marcador de inflamación intestinal sea de gran utilidad en pediatría. Por ello, el interés por la CF ha aumentado en los últimos años y han proliferado los estudios enfocados al análisis de su comportamiento en distintas enfermedades gastrointestinales pediátricas^{4, 6, 12, 28, 39,40, 44,134-136}.

Los pacientes en la franja de edad pediátrica, en España desde el nacimiento hasta los 18 años¹³⁷, se caracterizan por experimentar cambios a nivel físico de forma constante producto del crecimiento, lo que añade variaciones en la alimentación, la flora intestinal, el sistema inmunológico, etc. Estos factores, tal y como ya se ha comentado en este texto, parecen influir en los niveles de CF, por lo que es esperable que sean diferentes en cada etapa del desarrollo.

Por ello, algunos autores indican que el nivel de CF considerado como normal debe ser variable en función de la edad del paciente. Actualmente se acepta el uso en niños de 4 a 17 años del valor de corte establecido para adultos en algunos estudios (normal si $<50 \mu\text{g/g}$)^{7, 59,61}. Sin embargo, en los niños menores de esa edad no se han establecido unos puntos de referencia claros. Los trabajos diseñados a tal fin son escasos y se basan en muestras pequeñas, limitadas a una franja etaria, o de poblaciones distintas a la nuestra en aspectos capaces de alterar la CF como la alimentación y el nivel sociocultural. En la Tabla 1 aparecen los estudios más relevantes que reportan niveles de CF en población pediátrica sana.

Referencia	Año	Sujetos (n)	Edad	CF ($\mu\text{g/g}$)	País
Laforgia et al. ¹³⁸	2003	131	Primer meconio	Media 145 (+/- 79 DE)	Italia
Lisowska-Myjak et al. ¹³⁹	2018	20	Meconio	Mediana 228 (rango 35-1067)	Polonia
Nissen et al. ¹⁴⁰	2004	16	Rango 3-18 días	Mediana 235 (RIC 172-2880)	Holanda
Campeotto et al. ¹⁴¹	2004	69	Mediana 4 días (rango 3-7 días)	Mediana 167 (rango 22- 860)	Francia
Asgarshirazi et al. ¹⁴²	2017	54	Rango 0-2 semanas	Media 369 (+/- 204 DE)	Iran
			Rango 5-7 meses	Media 283 (+/- 381 DE)	
Baldassarre et al. ¹⁴³	2007	71	Edad 3 días	Mediana 195	Italia
			Edad 7 días	Mediana 245	
			Edad 12 días	Mediana 250 $\mu\text{g/g}$	
			Edad 30 días	Mediana 255	
Savino et al. ¹⁴⁴	2010	39	Mediana 45 días (rango 13-90 días)	Mediana 555 (rango 123-2000)	Italia
Olafsdottir et al. ¹⁴⁵	2002	27	Media 5.7 semanas (rango 2-10 semanas)	Media 277 (+/- 109 DE)	Noruega
Rugtveit et al. ¹⁴⁶	2002	20	Edad 6 semanas	Mediana 269 (RIC 193-808)	Noruega
Rugtveit et al. ¹⁴⁶	2002	20	Edad 3 meses	Mediana 264 (RIC 217-378)	Noruega
Lee et al. ¹⁴⁷	2017	133	Rango 0-6 meses	Media 237 (rango 12-1331)	Corea del Sur

Introducción

Dorosko <i>et al.</i> ¹⁴⁸	2008	77	Rango 3 días-6 meses	Mediana 207 (rango 23-359)	EEUU
Oord <i>et al.</i> ⁶¹	2014	9	Rango 1-6 meses	Mediana 192	Dinamarca
Li <i>et al.</i> ¹³³	2014	105	Media 2.9 meses (rango 1-5.9 meses)	Mediana 288 (RIC 198-482)	China
Rugtveit <i>et al.</i> ¹⁴⁶	2002	22	Edad 6 meses	Mediana 79 (RIC 35-215)	Noruega
Liu <i>et al.</i> ¹⁴⁹	2012	105	Media 6.0 meses (+/-0.2 DE)	Mediana 421 (rango 25-1268)	China (rural)
Liu <i>et al.</i> ¹⁴⁹	2012	39	Media 6.2 meses (+/-0.3 DE)	Mediana 140 (rango 26-1258)	China (urbano)
Hestvik <i>et al.</i> ¹⁵⁰	2011	54	Edad <1 año	Mediana 249 (RIC 180-403)	Uganda
Garg <i>et al.</i> ¹⁰²	2017	52	Edad <1 año	Mediana 128	Australia
Oord <i>et al.</i> ⁶¹	2014	12	Rango 6-12 meses	Mediana 72	Dinamarca
Rugtveit <i>et al.</i> ¹⁴⁶	2002	20	Edad 1 año	Mediana 67 (RIC 38-218)	Noruega
Roca <i>et al.</i> ¹⁵¹	2017	67	Edad <1 año	Percentil 95 910	España
Grondona <i>et al.</i> ¹⁵²	2014	133	Rango 1-12 meses	Mediana 94	Italia
Li <i>et al.</i> ¹⁵³	2015	288	Rango 1-18 meses	Mediana 174 (RIC 76-334)	China
Garg <i>et al.</i> ¹⁰²	2017	42	Rango 1-4 años	Mediana 22	Australia
Oord <i>et al.</i> ⁶¹	2014	20	Rango 1-2 años	Mediana 47	Dinamarca
Rugtveit <i>et al.</i> ¹⁴⁶	2002	19	Edad 2 años	Mediana 64 (RIC 29-248)	Noruega
Oord <i>et al.</i> ⁶¹	2014	24	Rango 2-3 años	Mediana 31	Dinamarca
Carroccio <i>et al.</i> ³⁹	2003	10	Mediana 3.5 años (rango 1-10 años)	Mediana 15 (rango 10-40)	Italia
Hestvik <i>et al.</i> ¹⁵⁰	2011	89	Rango 1-4 años	Mediana 75 (RIC 53-119)	Uganda
Roca <i>et al.</i> ¹⁵¹	2017	60	Rango 1-4 años	Percentil 95 286	España
Davidson <i>et al.</i> ¹⁵⁴	2016	87	Rango 1-3.9 años	Mediana 49	Reino Unido
Oord <i>et al.</i> ⁶¹	2014	8	Rango 3-4 años	Mediana 36	Dinamarca
Zhu <i>et al.</i> ¹⁵⁵	2016	274	Mediana 29.4 meses (rango 12-48.2)	Mediana 83 (RIC 15-419)	China
Song <i>et al.</i> ¹⁵⁶	2017	234	Rango 6 meses-4 años	Mediana 24.5 (rango 12-1033)	Corea del Sur
Rugtveit <i>et al.</i> ¹⁴⁶	2002	15	Edad 5 años	Mediana 49 (RIC 30-89)	Noruega
Olafsdottir <i>et al.</i> ¹⁴⁵	2002	24	Media 5.3 años (rango 1-13 años)	Media 40 (+/- 28 DE)	Noruega

Introducción

Berni Canani et al. ⁴⁴	2004	76	Mediana 6.5 años (rango 13 meses-18 años)	Mediana 28 (RIC 15-57)	Italia
Soto-Méndez et al. ¹⁵⁷	2017	87	Media 4.5 años (rango 1.9-6.8 años)	Mediana 58 (rango 10-950)	Guatemala
Nissen et al. ¹⁴⁰	2004	21	Media 7 años (rango 1-15 años)	Mediana 17 (RIC 7-41)	Holanda
Bunn et al. ⁵⁸	2001	31	Mediana 6.8 años (rango 1.5-15.3)	Mediana 11	Reino Unido
Joshi et al. ¹⁵⁸	2010	26	Rango 2-9 años	Mediana 34 (rango 18-213)	Reino Unido
Garg et al. ¹⁰²	2017	20	Rango 4-10 años	Mediana 20	Australia
Hestvik et al. ¹⁵⁰	2011	159	Rango 4-12 años	Mediana 28 (RIC 25-35)	Uganda
Roca et al. ¹⁵¹	2017	47	Rango 4-12 años	Percentil 95 54	España
Fagerberg et al. ⁵⁹	2003	117	Rango 4-17 años	Mediana 13.6 (IC 95% 9.9-19.5)	Suecia
Bremner et al. ⁴⁰	2005	7	Mediana 12 años (rango 4-17 años)	Mediana <15.6 (rango <15.6-39)	Reino Unido
Davidson et al. ¹⁵⁴	2016	636	Rango 4-17.9 años	Mediana 40	Reino Unido
Joshi et al. ¹⁵⁸	2010	14	Rango 10-19 años	Mediana 22 (rango 11-60)	Reino Unido

Tabla 1: estudios que reportan niveles de CF en población pediátrica sana. DE: desviación estándar. RIC: rango intercuartílico. IC: intervalo de confianza.

Sería de gran utilidad clínica determinar los valores de normalidad de CF en niños, como primer paso para establecer puntos de corte por encima de los cuales aumente significativamente la probabilidad de sufrir un proceso relevante. Esto ayudaría a la correcta interpretación de los niveles de CF en los pacientes pediátricos.

1.5.2 EL MODO DE NACIMIENTO, LA EDAD GESTACIONAL, EL PESO AL NACIMIENTO

Las publicaciones que analizan la relación de los factores perinatales con los niveles de CF arrojan datos discordantes. Así, en cuanto al tipo de nacimiento, algunos estudios encuentran cifras superiores en los nacidos por vía vaginal frente a aquellos nacidos por cesárea¹⁴⁷, mientras que otros no refieren diferencias^{133,138}.

Algunos autores describen una correlación negativa entre la edad gestacional y la CF¹³⁸, que no se confirma en otros trabajos^{51, 140,159}.

De igual forma, algunas publicaciones han descrito una correlación negativa de la CF con el peso al nacimiento¹³⁸ no confirmada en otras series^{133, 149,155}.

1.5.3 LA LACTANCIA

Ciertas publicaciones sugieren una relación entre el tipo de lactancia y la CF, aunque ofrecen resultados dispares. Algunos autores describen valores de CF inferiores en los alimentados con lactancia materna (LM) respecto a los alimentados con fórmula, lo que podría apoyar la hipótesis del papel anti-inflamatorio de la leche materna^{160–163}. Sin embargo, otros reportan resultados opuestos, encontrando cifras de CF más altas en los alimentados con LM exclusiva que en los que reciben fórmula o lactancia mixta^{142, 147,148,153}. Por último, existen trabajos en los que no se identifican diferencias en ninguno de los sentidos^{141, 143,151}.

1.5.4 LA ANTROPOMETRÍA

Algunos estudios describen niveles de CF más altos en niños con Z-scores bajos de talla para la edad, peso para la edad y peso para la talla. Esto puede apoyar la hipótesis de que la alteración de la permeabilidad intestinal se asocia con un retraso del crecimiento^{153,164,165}. No obstante, otros autores no encontraron esta relación^{155,157}.

Un estudio con 300 adultos de 50 a 70 años objetivó que los niveles de CF se relacionaban de forma significativa con la obesidad, la baja ingesta de fibra y la falta de ejercicio físico^{38,166}. En otro trabajo con adultos obesos, se observó que en aquellos con CF basal elevada (>50 µg/g), la pérdida de peso producía una reducción significativa de la CF¹⁶⁷. Los datos sobre población pediátrica obesa son escasos aunque algunas

publicaciones encuentran una correlación significativa entre el Z-score de IMC y los niveles de CF¹⁶⁸.

1.5.5 LA TOMA DE MEDICAMENTOS

Ciertos medicamentos utilizados con frecuencia en pediatría, como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), pueden provocar una inflamación que eleva la concentración de leucocitos en la mucosa intestinal y, consecuentemente, los valores de CF^{12, 16, 27, 169, 170}. Otros fármacos de uso habitual como los IBP también se han asociado a niveles superiores de CF^{129, 130}, aunque publicaciones recientes no confirman esta relación¹⁷¹.

La posible causa de la elevación de la CF probablemente sea específica para cada fármaco, aunque se ha sugerido la influencia sobre la microbiota intestinal como posible mecanismo común para varios principios activos¹⁷².

1.5.6 OTROS

La potencial influencia de factores ambientales y socioeconómicos ha despertado el interés de muchos investigadores. Así, Liu *et al.* encontraron valores de CF superiores en lactantes sanos de medio rural frente a los de medio urbano¹⁴⁹. El hallazgo se atribuyó a la probable inflamación intestinal subclínica crónica que pudiera afectar a los niños de medios más desfavorecidos. Sin embargo, Hestvik *et al.* encontraron en niños sanos de Uganda niveles de CF similares a los descritos en otros trabajos llevados a cabo en entornos con mayor desarrollo, por lo que defienden que el nivel socio-cultural no debe de influir en los valores de esta proteína¹⁵⁰.

Además, se ha descrito una variabilidad de la determinación del nivel de CF de un mismo paciente en distintos momentos, aunque no se dispone de suficientes datos

que lo confirmen. En adultos, se objetiva una variación no despreciable en determinaciones seriadas en pacientes con EII en fase activa y en sujetos con neoplasias colónicas. Sin embargo, al analizar las muestras de un grupo control sano, o de pacientes con EII en remisión, dicha variabilidad parece ser mucho menor^{12,178-181}. Por este motivo, se considera que esta posibilidad no afectará de forma apreciable a los resultados del presente estudio.

Además, probablemente participen otros muchos factores en la elevación de la CF en la edad pediátrica, aún por identificar, y existe en definitiva la necesidad de ampliar el conocimiento de este biomarcador con trabajos como el presente.

1.6 DETERMINACIÓN DE LA CF

Desde su primera descripción en 1980 por Fargehol et al.¹, y en paralelo con los avances hacia una mejor comprensión de las posibles utilidades de esta proteína, las técnicas de laboratorio para la determinación de CF se han ido perfeccionando en los últimos años.

Existen varios métodos para ello, pero todos se basan en la unión de un anticuerpo a la CF. Los anticuerpos empleados pueden ser policlonales o monoclonales, aunque los últimos han mostrado una mayor precisión¹⁷⁵. Los métodos más utilizados son el enzimoimmunoanálisis, el inmunoensayo de flujo lateral y la inmunoturbidimetría.

1.6.1 ENZIMOIMMUNOANÁLISIS

La técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA, acrónimo de "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay") ya se describe para la determinación de la CF en 1992 por Roseth et al., que expresaron los resultados en "miligramos por litro de homogeneizado fecal" (mg/L)^{7,14}. Actualmente, la concentración de CF se expresa en µg/g de heces, y varios autores afirman que los resultados obtenidos con las pruebas utilizadas previamente pueden compararse con los del nuevo método multiplicando los valores de CF por cinco^{16,176}.

Es un método muy contrastado, pero precisa un laboratorio especializado. La realización de la técnica requiere de un periodo de dos horas pero deben reclutarse varias decenas de muestras para que el análisis sea coste-efectivo, lo que puede retrasar la obtención del resultado.

Se usa concretamente el ELISA tipo sándwich, con una pareja de anticuerpos (de captura y de detección), cada uno de ellos específico para una región o epítopo del antígeno que se quiere detectar¹⁷⁷. Debe garantizarse esta especificidad de unión y evitar solapamientos para alcanzar resultados exactos. Al usar una pareja de anticuerpos para detectar un mismo antígeno aumenta la especificidad y la sensibilidad de esta prueba respecto al ELISA directo o indirecto^{178,179}. La técnica ELISA tipo sándwich se desarrolla en los siguientes pasos (Figura 4).

1. La placa de pocillos se tapiza con el anticuerpo de captura.
2. Se añade la muestra a estudio (antígeno).
3. Se añade el anticuerpo de detección conjugado con una enzima.
4. La enzima acoplada cataliza una reacción que genera una señal cuya intensidad será proporcional a la presencia de antígeno y se puede medir con un detector específico.

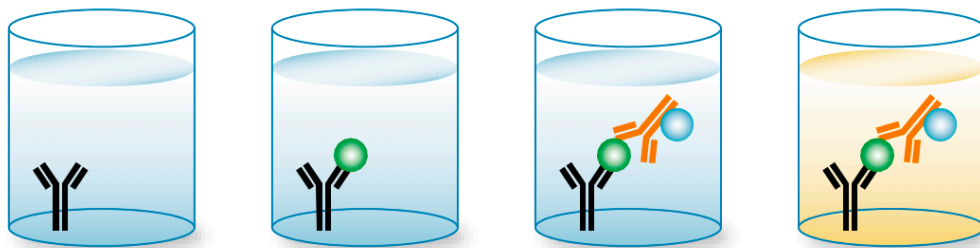


Figura 4: ELISA tipo sándwich. 1. Ac de captura (negro). 2. Se añade el Ag (verde), presente en la muestra a estudio. 3. Se añade el Ac de detección (naranja), en este caso conjugado con una enzima. 4. La enzima acoplada al Ac cataliza una reacción cuyo producto genera una señal que puede ser medida con un detector específico. Ac: anticuerpo. Ag: antígeno. Adaptado de referencia¹⁷⁸.

Para la determinación de CF, las placas de microtitulación (micropocillos) son tapizadas por Ac Anti-calprotectina para captura. Se añade la muestra (homogeneizado fecal) y por último el Ac secundario marcado (conjugado purificado Anti-calprotectina-fosfatasa alcalina), siguiendo el esquema mostrado en la Figura 4.

La lectura proporciona un resultado cuantitativo que incluye un rango de valores muy amplio (actualmente variable de 10-600 µg/g hasta 30-1800 µg/g en función del kit).

1.6.2 INMUNOENSAYO DE FLUJO LATERAL

El inmunoensayo o inmunocromatografía de flujo lateral es una de las técnicas más empleadas actualmente tanto en laboratorios hospitalarios como en las llamadas “pruebas a pie de cama” o POCT (acrónimo de “point-of-care testing”). Esta técnica se basa en la migración de una muestra a través de una membrana de nitrocelulosa tal y como aparece representado en la Figura 5.

La muestra se añade en la zona del conjugado, formado por un anticuerpo específico contra uno de los epítomos del antígeno a detectar, la CF, y un reactivo de detección. Si la muestra contiene CF, se unirá al conjugado formando un complejo inmune y migrará a través de la membrana de nitrocelulosa. Si en la muestra no hay CF (o está presente en niveles muy bajos), migrarán el conjugado y la muestra sin unirse.

La línea de test está formada por un segundo anticuerpo específico contra otro epítomo del antígeno. Al llegar la muestra a esta zona, los complejos formados por la unión del antígeno y conjugado quedarán retenidos y la línea se coloreará (muestras positivas). La línea de control está formada por un tercer anticuerpo que reconoce al reactivo de detección. Cuando el resto de la muestra alcanza esta zona, el anticuerpo se unirá al conjugado libre que no ha quedado retenido en la línea de test. Esta línea confirma la adecuada realización de la prueba, porque se colorea siempre, con muestras positivas y negativas¹⁸⁰.

Introducción

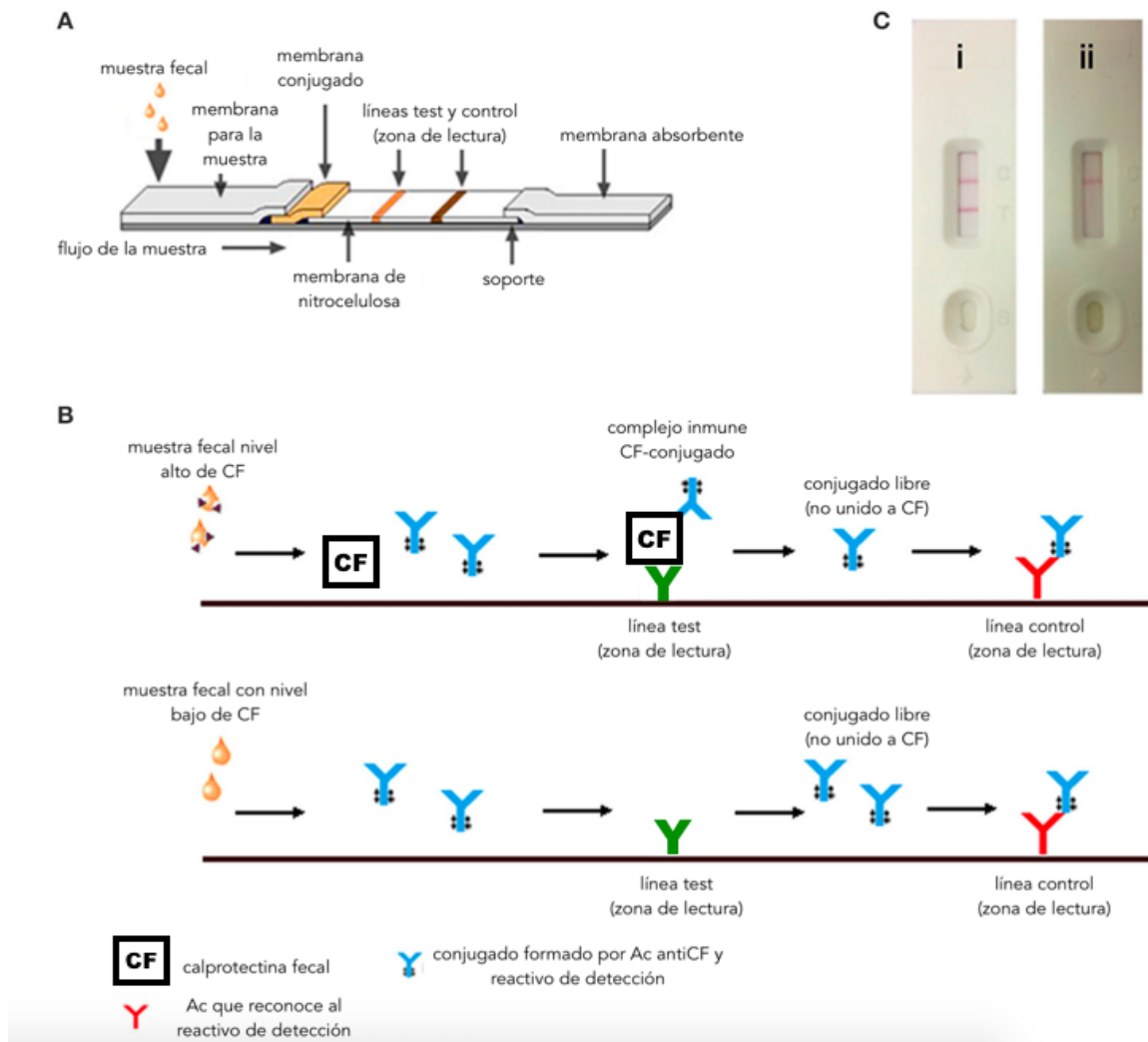


Figura 5: inmunoensayo de flujo lateral. A: diagrama esquemático del kit utilizado para la prueba. B: principio de la técnica: la muestra se añade en la zona del conjugado formado por un anticuerpo específico contra uno de los epítomos del antígeno a detectar (la CF) y un reactivo de detección (azul). Si la muestra contiene CF, esta se unirá al conjugado formando un complejo inmune y migrará a través de la membrana de nitrocelulosa. La línea de test está formada por un segundo anticuerpo específico contra otro epítomo del antígeno (verde). Al llegar a esta zona, los complejos formados por la unión del antígeno y conjugado quedarán retenidos y la línea se coloreará en este caso como rosa o azul (muestras positivas). La línea control está formada por un tercer anticuerpo que reconoce al reactivo de detección (rojo). Cuando el resto de muestra alcanza esta zona, el anticuerpo se unirá al conjugado libre. C: interpretación de los resultados: (i), positivo (2 líneas coloreadas) y (ii), negativo (solo se colorea la línea control). Adaptado de referencia¹⁸⁰.

Ha sido validado respecto a la técnica ELISA¹⁸¹ y tiene la ventaja de no precisar de un laboratorio especializado y no requerir la acumulación de varias decenas de muestras para que el coste sea asumible, lo que permite disponer de resultados en pocos minutos.

Esta prueba permitía inicialmente la determinación semi-cuantitativa de CF, presentando unos valores de corte de 50 µg/g y 200 µg/g. Posteriormente se han desarrollado dispositivos de lectura que pueden ofrecer un valor cuantitativo en 12-15 minutos. El lector analiza la intensidad de la señal de la línea de prueba y control para dar el resultado, con distintos rangos de detección y distintas sensibilidades en función del kit concreto que se utilice, actualmente variable entre 30-300, 100-1800 y 30-1000 µg/g¹⁸¹⁻¹⁸⁴.

El laboratorio Bühlmann desarrolló recientemente una prueba de CF basada en esta técnica asociada a una aplicación para teléfonos inteligentes (IBDoc®) que convierte la cámara del teléfono en un lector para mediciones cuantitativas en el hogar. Este software permite a los pacientes realizar una medición y recibir el resultado en unos minutos, siempre que haya una conexión a Internet disponible (Figura 6). El método ha demostrado buena correlación con los lectores de flujo lateral utilizados en el medio hospitalario^{184,185}. Su uso aún no se ha generalizado, pero probablemente aumentará en los próximos años y facilitará la monitorización de pacientes con EI.

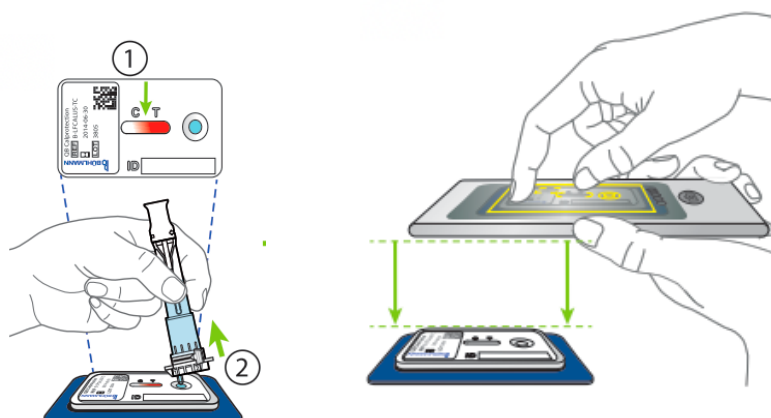


Figura 6: el kit IBDoc® permite a los pacientes analizar la CF en el domicilio. La cámara integrada en el teléfono móvil haría la función de lector para ofrecer una cifra cuantitativa¹⁸⁶.

1.6.3 INMUNOTURBIDIMETRÍA

De forma más reciente se ha introducido el análisis de CF mediante inmunturbidimetría, técnica que se basa en la valoración de la atenuación de un haz de luz al atravesar una solución de partículas (complejos antígeno-anticuerpo en este caso). Dicha disminución es debida a procesos de absorción, dispersión y reflexión que experimenta la luz debido a las partículas, tal y como se representa en la Figura 7.

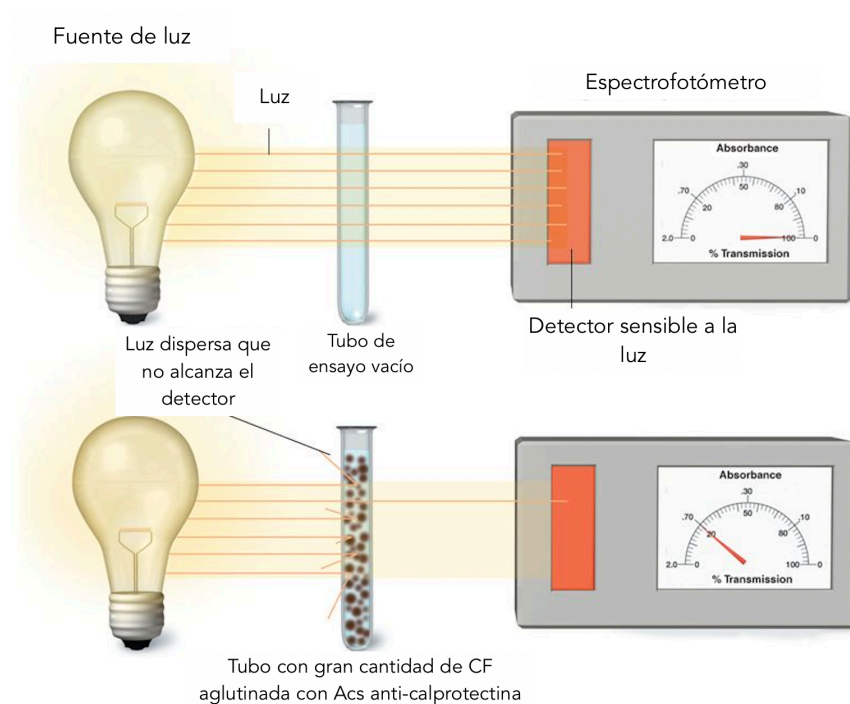


Figura 7: la inmunturbidimetría se basa en la valoración de la atenuación de un haz de luz al atravesar una solución de partículas (complejos antígeno-anticuerpo), medida en la misma dirección en que es emitida.

El nuevo ensayo turbidimétrico de calprotectina basado en látex, el BÜHLMANN fCAL® turbo (BÜHLMANN Laboratories AG, Suiza), fue comercializado en 2016 y utiliza partículas recubiertas con anticuerpos anti-calprotectina humana, de forma que turbidez debida a la aglutinación es proporcional a la concentración de CF.

Introducción

Interpolando la medida de la absorbancia de la muestra en una curva de calibración podemos conocer la concentración de CF. Los niveles se informan en $\mu\text{g/g}$ de heces considerando una dilución de la muestra de 1:500 en tampón de extracción y ofreciendo un rango de determinación cuantitativa entre 20 y 8000 $\mu\text{g/g}$ en tan solo diez minutos¹⁸⁷.

1.7 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA FECAL A ESTUDIO

Para estudiar los niveles de CF, solo se precisan 5 g de heces. Las muestras pueden guardarse hasta 7 días a temperatura ambiente sin observarse pérdida apreciable de su concentración, y una vez congeladas y almacenadas a -20°C pueden mantenerse estables hasta 10 semanas en función del tipo de preparación^{7, 15, 22, 155,195}.

El procedimiento de preparación de la muestra de heces ha cambiado con el tiempo. El método tradicional implicaba pesarlas para obtener 5 g, lo que resultaba poco práctico. A partir del año 2000, se utiliza una nueva técnica que aumenta hasta en cinco veces el rendimiento del procedimiento original, lo que se debe al uso de agentes como la urea en la solución de extracción, que pueden disociar los agregados de CF^{7,189}.

Actualmente existen dispositivos de extracción que facilitan el procesamiento, disminuyen el tiempo de preparación y reducen el riesgo de contaminación. La primera versión de dichos dispositivos vio la luz en 2008. Fue el Smart-Prep® faecal sample preparation kit (Roche diagnostics, Mannheim, Alemania) que se muestra en la Figura 8, con una cámara que puede contener aproximadamente 85 mg de muestra de heces, a la que se agregan 4 ml de solución o tampón de extracción específico para obtener una dilución de 1:50.

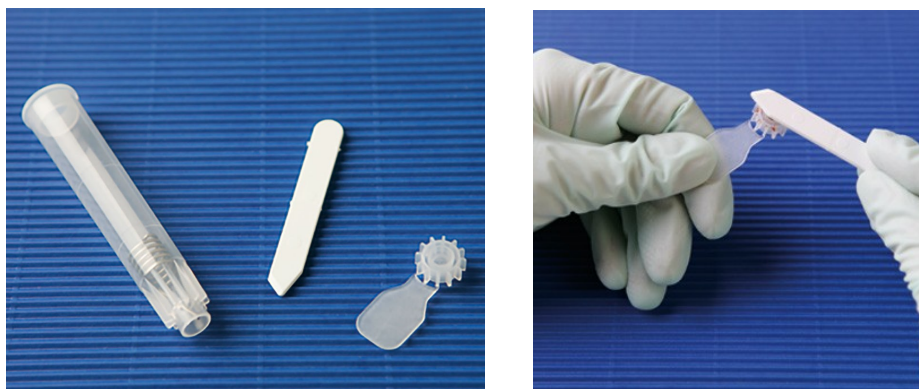


Figura 8: Smart-Prep faecal sample preparation kit. Tomado de referencia¹⁹⁰.

Recientemente, se han desarrollado versiones más refinadas de este dispositivo. En 2014 se comercializó el Bühlmann CALEX® cap (Bühlmann Laboratories AG, Basilea, Suiza), que se muestra en la Figura 9. Está precargado con la solución tampón específica y contiene una pinza de muestreo. Las ranuras de la pinza transportan la cantidad necesaria de materia fecal, que se diluye en el correspondiente volumen de tampón para obtener la proporción requerida. Con este método se obtiene una dilución de la muestra de 1:500, que es la óptima para realizar las pruebas enumeradas previamente. Aporta además las ventajas de disminuir el riesgo de contaminación al utilizarse tubos cerrados de un solo uso y precisar una muestra de menor cantidad (0-100 mg de heces comparado con los 5 g necesarios para la prueba clásica).

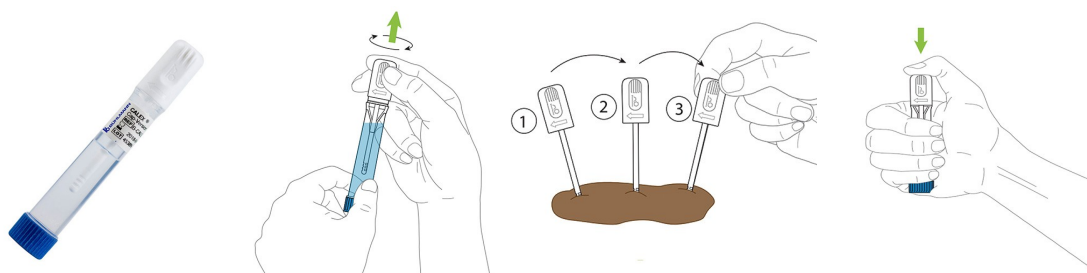


Figura 9: dispositivo Bühlmann CALEX® cap. Se extrae la pinza de muestreo girando la tapa blanca hacia la derecha y tirando hacia arriba. Se sumerge la pinza en la muestra y se gira antes de retirarlo. Ha de repetirse 3-5 veces en diferentes puntos de las heces. Se vuelve a colocar la pinza en el tubo y se presiona firmemente hacia abajo hasta sentir y escuchar dos clics. Adaptado de referencia¹⁸⁶.

El proceso de homogeneizado también se ha simplificado con el tiempo. Inicialmente se mezclaban 5 g de muestra con 10 ml de solución buffer de extracción (pH 8.4) que se colocaban en un tubo abierto en un homogeneizador mecánico (Ultra Turrax) y se centrifugaban a 10000 g durante 20 min. Después, los homogeneizados se centrifugaban a 45000 g durante 20 min a +4°C, se separaba la mitad superior del sobrenadante y se congelaba a -20°C para su análisis por ELISA tipo sándwich.

La preparación de la muestra con los kits de extracción posteriores tipo Smart-Prep® o Bühlmann CALEX® cap solo precisan la homogeneización de la muestra en un mezclador vibratorio (Vortex) durante 60 y 30 segundos respectivamente.

La concentración de CF se expresa actualmente en $\mu\text{g/g}$ de heces, independientemente del método utilizado. Sin embargo, los estudios que comparan los distintos métodos de manipulación preanalítica de la muestra de heces han demostrado que este factor contribuye a la variabilidad del resultado. Por ello, sería crucial alcanzar una estandarización para asegurar resultados de CF comparables y fiables¹⁸⁹.

2 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

La CF es un marcador de inflamación intestinal especialmente útil en el diagnóstico y monitorización de la EII. Ofrece ventajas como la extracción no invasiva de la muestra y su estabilidad, así como la potencial rapidez y escaso coste económico de su análisis. Sin embargo, es un marcador inespecífico, pues también aumenta en otros cuadros gastrointestinales agudos y crónicos y puede verse afectado por factores como la dieta, la antropometría, los datos perinatales y especialmente la edad.

Estudios anteriores sugieren que los niños tienden a tener niveles más altos de CF que los adultos, pero el rango de referencia pediátrico no ha sido claramente establecido. Algunos de estos estudios analizaron muestras pequeñas y/o fueron realizados en poblaciones heterogéneas y muestran una amplia variabilidad entre grupos etarios.

Conocer las cifras de normalidad en niños sanos así como los factores que pueden modificarla permitiría mejorar la interpretación de la CF como biomarcador y facilitar la toma de decisiones clínicas tras su estudio. Ayudaría no solo a seleccionar a los pacientes que precisen otras pruebas que confirmen la presencia, tipo y extensión de inflamación intestinal; sino a evitar la realización de pruebas invasivas en aquellos que no las necesiten, con la consecuente disminución de molestias para el paciente y optimización de recursos disponibles.

Además, este estudio podría impulsar nuevas líneas de investigación para definir otras variables que puedan modificar la CF y su comportamiento en enfermedades en las que su papel, aún no plenamente establecido, pudiera resultar útil.

2.2 HIPÓTESIS

Los valores normales de CF en niños sanos no han sido claramente definidos. Es probable que las cifras de normalidad sean diferentes en los distintos grupos etarios, pudiendo alterarse tanto por antecedentes perinatales como por el tipo de lactancia, la antropometría o la asistencia a un centro escolar.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

1. Describir los valores de referencia de CF en población pediátrica sana.

2.3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Describir posibles diferencias del valor de CF entre grupos etarios y conocer si existe correlación entre la edad y el nivel de CF.
2. Determinar si los antecedentes perinatales como la edad gestacional, el peso al nacimiento o el tipo de parto influyen en los valores de CF.
3. Estudiar si la alimentación recibida durante los primeros meses de vida afecta a la CF.
4. Conocer si los datos antropométricos pueden influir sobre los niveles de CF.
5. Describir si el acudir a guardería o centro escolar puede influir en el valor de CF.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio transversal, multicéntrico y observacional llevado a cabo en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (HIUNJ) asociado a la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Madrid, entre septiembre de 2014 y diciembre de 2016.

Los Centros de Salud participantes fueron los de Goya, Ibiza, Montesa y Daroca, situados en la denominada Zona Básica de Salud del Área Única de Goya, en el área metropolitana de Madrid.

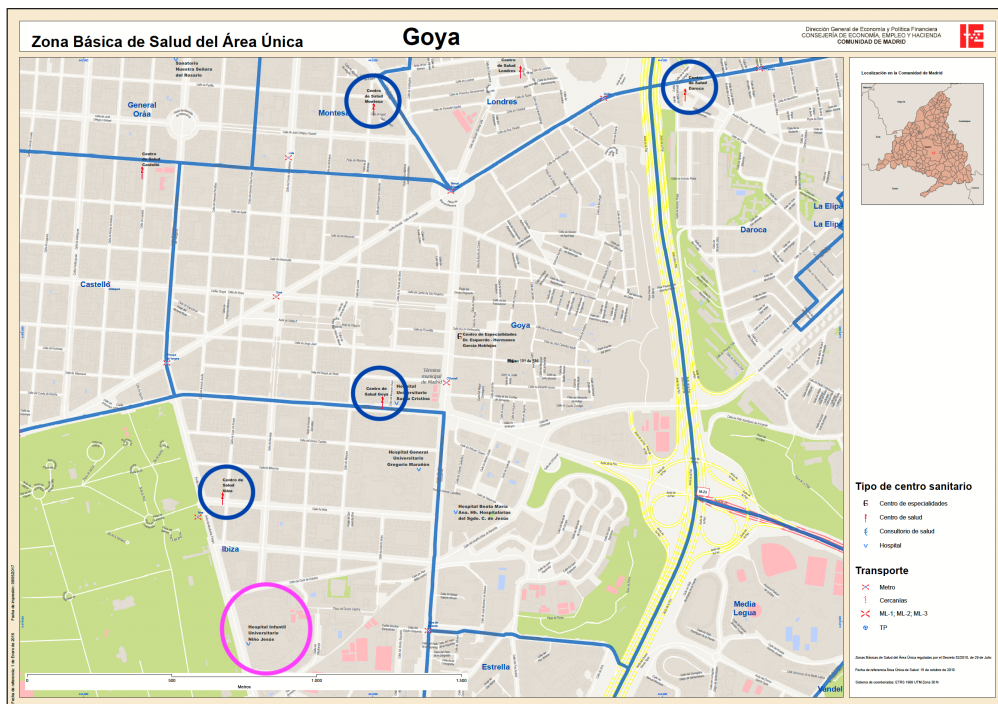


Figura 10: marcado en rosa, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Marcados en azul, los Centros de Salud de Goya, Ibiza, Montesa y Daroca. Adaptado de página web de la Comunidad de Madrid¹⁹¹.

3.2 SUJETOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

3.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Se reclutaron para el estudio donantes voluntarios sanos de 0 a 18 años que acudieron a los Centro de Salud de Goya, Ibiza, Montesa y Daroca para control rutinario o para vacunación entre enero de 2015 y diciembre de 2016.

Se estableció como definición de niño sano la aceptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS): “Estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades”¹⁹².

3.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Criterios de exclusión absolutos que impedían la participación del sujeto en el estudio:
 - Sujetos que no tuvieran un estado de salud, según la definición de la OMS.
 - Voluntarios que tuvieran el antecedente o fueran diagnosticados en el curso del estudio de enfermedad autoinmune, inmunodeficiencias o afectación gastrointestinal como FQ, enfermedad celiaca, EII, enteropatía alérgica o enfermedad por reflujo gastroesofágico.
- Criterios de exclusión relativos que obligaban a retrasar la obtención de la muestra:
 - Síntomas gastrointestinales en el momento de la recogida de la muestra o en los 30 días previos: dolor abdominal, vómitos, diarrea definida como un aumento en el número de deposiciones diarias o cambio en la

consistencia de las mismas a tipo 6-7 de la escala de Bristol¹⁹³, y fisura anal.

- Toma de alguno de los siguientes medicamentos (excepto administración tópica) en los 15 días previos a la recogida de la muestra: inmunomoduladores (como corticoides, ciclosporina, tacrólimus, azatioprina, metotrexate, montelukast etc), antibióticos, IBP, probióticos, o AINEs.
- Hallazgo en el estudio de la muestra de disbacteriosis, infección por adenovirus y/o rotavirus (en menores de 5 años), coprocultivo positivo o presencia de parásitos en heces.

3.3 INCLUSIÓN DE SUJETOS

3.3.1 RECLUTAMIENTO DE PARTICIPANTES

El pediatra o enfermero de Atención Primaria colaborador seleccionó a los sujetos que cumplieran los criterios de inclusión (y ninguno de los criterios de exclusión). Si los padres o tutores aceptaban participar, se entregaba la documentación, consistente en:

- Hoja de información sobre el estudio para los padres o tutores (y para el participante si era mayor de 12 años).
- Consentimiento informado para firmar por los padres o tutores (y por el participante si era mayor de 12 años).

Se facilitaba un envase para la recogida de la muestra de heces con la pegatina identificativa que debía acompañar al mismo, y se explicaba a los padres o tutores cómo debía recogerse en el domicilio (ver Anexo: documentación complementaria para el estudio).

3.3.2 RECOGIDA DE DATOS

El pediatra o enfermero responsable completó el formulario con los siguientes datos del sujeto:

- **Datos identificativos:** número de identificación como participante en el estudio (ID), iniciales, fecha de nacimiento, sexo.
- **Antropometría:** talla (cm), peso (Kg), Índice de masa corporal, IMC (Kg/m²).

- **Datos perinatales:** edad gestacional (semanas), siendo clasificados como recién nacidos "a término" (entre las 37 y las 41+6 semanas), "pretérmino" (<37 semanas) y "postérmino" (≥ 42 semanas); peso al nacimiento (Kg); tipo de nacimiento (parto o cesárea), tipo de lactancia en los menores de 6 meses (lactancia materna exclusiva, fórmula de inicio de forma exclusiva o lactancia mixta).
- **Datos sociodemográficos:** tipo de municipio en el que habita el participante (rural, medio o urbano, según la definición basada en el número de habitantes del Instituto Nacional de Estadística como "rurales" (≤ 2000 habitantes), "medios" (2001 a 10000 habitantes) y "urbanos" (> 10000 habitantes) y asistencia del sujeto a centro escolar (ninguno, guardería o colegio/instituto).
- **Datos sobre la muestra:** fecha de recogida.

Se estudió el tipo de alimentación recibida solo en el subgrupo de voluntarios menores de 6 meses, dada la menor variabilidad en este grupo de edad, con solo 3 opciones: lactancia materna exclusiva, fórmula de inicio de forma exclusiva o lactancia mixta.

3.4 RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

3.4.1 RECOGIDA DE MUESTRAS

Una vez recogida la muestra, se refrigeró en nevera doméstica (temperatura aproximada de 2 a 4° C) hasta su entrega en las 24 h siguientes en el Centro de Salud, donde se conservaba también entre 2 y 4° C.

El pediatra o enfermero recogió la muestra, la hoja de datos y el consentimiento firmado por los padres o tutores, y también por el participante en los mayores de 12 años (ver Anexo: documentación complementaria para el estudio).

En un plazo máximo de 48 horas desde su recepción, uno de los investigadores o de los colaboradores llevó la muestra al laboratorio del hospital.

3.4.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS (LABORATORIO DEL HIUNJ)

Determinación del nivel de CF

Se prepararon las muestras con el dispositivo Bühlmann CALEX® cap (Bühlmann Laboratories AG, Basilea, Suiza) (Figura 9) y se analizaron con el test tipo inmunoensayo de flujo lateral (Quantum Blue fCAL Extended test, Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Suiza). El proceso fue el siguiente:

1. Retirada de la pinza de muestreo del dispositivo CALEX® Cap.
2. Introducción de la pinza de muestro con las ranuras dentro de las heces.
Repetición en 3 posiciones diferentes de la muestra hasta llenar completamente las ranuras.
3. Colocación de la pinza de muestreo en el interior del cuerpo del dispositivo CALEX® Cap.

4. Agitación vigorosa en un mezclador vorticial durante 30 segundos.
5. Reposo de la muestra durante 10 minutos.
6. Adición de 60 μL de la dilución en el casete que se introduce en el lector (Quantum Blue® Reader). Lectura de los resultados a los 12 minutos.

La prueba tiene un rango de determinación de CF de 30 a 1000 $\mu\text{g/g}$, por lo que valores inferiores o superiores a estas cifras son informados como CF $<30 \mu\text{g/g}$ o CF $>1000 \mu\text{g/g}$ respectivamente. Dada la imposibilidad de conocer el valor cuantitativo real de CF en estos casos, se decidió sustituir estos datos por 30 $\mu\text{g/g}$ y 1000 $\mu\text{g/g}$ respectivamente para el análisis estadístico.

Estudio microbiológico

Se realizó coprocultivo, determinación de antígenos (Ag) de rotavirus y adenovirus en menores de 5 años y determinación de parásitos.

A. Coprocultivo

Las muestras se sembraron en los siguientes medios (bioMérieux®, S.A., Marcy l'Etoile, France):

- Agar BCP: aislamiento de enterobacterias patógenas.
- Agar XLD: aislamiento de enterobacterias patógenas (especialmente de *Shigella spp.* y *Salmonella spp.*).
- Agar Campylosel: aislamiento selectivo de *Campylobacter spp.*
- Agar Yersinia CIN: aislamiento selectivo de *Yersinia enterocolitica*.
- Caldo Selenito F: aislamiento de *Salmonella spp.*

Procedimiento:

Material y métodos

1. Incubación de los medios de cultivo inoculados a 37 °C en atmósfera aeróbica durante 24-48 horas excepto los medios de Agar Campylosel, cuya temperatura de incubación fue de 42 °C y bajo condiciones de microaerofilia.
2. Lectura de las placas.

B. Determinación de Ag de rotavirus y adenovirus (solo en menores de 5 años)

Se utilizó una técnica de inmunoensayo de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de Ags de rotavirus y adenovirus. Se usó una membrana de nitrocelulosa previamente fijada con Ac monoclonales de ratón frente a rotavirus y adenovirus (línea test) y con Acs policlonales de conejo frente a una proteína específica (línea control). En las muestras positivas, los Ags avanzan por capilaridad a través de la membrana y son capturados por los Acs respectivos, siendo visibles en la línea coloreada correspondiente. Así, en el material absorbente para la muestra hay dispensadas tres preparaciones de reactivos (CerTest® rotavirus/adenovirus, CerTest BioTec S.L., España):

- Línea test con Acs monoclonales de ratón frente a rotavirus, conjugados con látex de poliestireno rojo.
- Línea test con Acs monoclonales de ratón frente a adenovirus, conjugados con látex de poliestireno azul.
- Línea control con una proteína específica de unión, conjugada con látex de poliestireno verde.

Procedimiento:

1. Apertura del tubo para dilución y con ayuda de una varilla y toma de una cantidad suficiente de muestra. Se cierra y se agita para favorecer la dispersión.
2. Colocación del envase individual del test sobre una superficie horizontal añadiendo 5 gotas de la muestra diluida en la zona blanca del extremo del test.
3. Lectura del resultado a los 10 minutos.

La restricción de la determinación de rotavirus y adenovirus a los sujetos menores de 5 años se decidió en base a las publicaciones sobre su incidencia por edades en nuestro medio. La importante disminución a partir de dicha edad, hace poco rentable su estudio en niños mayores ¹⁹⁴.

C. Determinación de parásitos

Se utilizó un método de concentración de heces por sedimentación para favorecer la observación de huevos y larvas de helmintos, así como quistes de protozoos, mediante el kit ParasiTrap®-System (Biosepar, Germany).

Procedimiento:

1. Introducción de una alícuota de la muestra en el tubo A con solución de formalina. Se agita para favorecer su homogeneización.
2. Adición de 1 ml de acetato de etilo. Se inserta el tubo A en un segundo tubo (B) que posee un sistema de filtrado y se invierte el conjunto.
3. Mezcla en el agitador con el fin de transferir la muestra al tubo B someténdola a una filtración fina activa.
4. Centrifugado del filtrado a 2500 rpm durante 5 minutos.
5. Tras la centrifugación, se decanta la capa superior de consistencia sólida.
6. Suspensión del concentrado de heces con 2-3 gotas de lugol.
7. Observación al microscopio.

Los resultados de estos análisis se registraron en el software utilizado en el HIUNJ (Modulab®) asociado a las iniciales del participante, asignando a los mismos un número de historia provisional. Se completó con estos resultados el formulario de cada sujeto para su inclusión posterior en la base de datos.

3.5 CONTROL DE PARTICIPANTES CON CF ELEVADA

En caso de identificar muestras con un nivel de CF elevado (considerándose como tal valores superiores a 50 µg/g de heces)^{7, 16, 19, 59, 61}, los investigadores del estudio contactaron con los padres o tutores del sujeto. Se comunicó el resultado, y se realizó una anamnesis exhaustiva, para detectar la existencia de criterios de exclusión o de fallos en la recogida de la muestra.

En los casos en los que se identificó alguno de los criterios de exclusión relativos, se solicitó a los padres o tutores la entrega de una muestra, transcurrido el tiempo indicado en cada caso, para corroborar el resultado.

A los participantes con CF superior a 1000 µg/g, además de requerir una segunda muestra para estudio, se les solicitó por vía telefónica autorización para contactar con la familia transcurrido un periodo mínimo de dos años. En dicho control telefónico se solicitaría información sobre la evolución del sujeto (desarrollo ponderoestatural, aparición de síntomas digestivos y diagnósticos de cuadros gastrointestinales).

En la hoja de información que se entregó a los participantes se especificaba el nombre de los investigadores colaboradores, y la forma de contacto (incluyendo el número de la extensión del busca de la sección de Gastroenterología) para la resolución de dudas que pudieran surgir durante el estudio.

3.6 VALORACIÓN POR COMITÉS DE ÉTICA

Este estudio ha sido valorado y aprobado por los siguientes comités:

- Comité de Ética e Investigaciones Clínicas GAE Niño Jesús, en noviembre de 2014, con código interno R-0063/14 (ver anexos).

- Comisión Central de Investigación del Servicio Madrileño de Salud (Gerencia de Atención Primaria), en marzo de 2015, con código de protocolo 05/15 (ver anexos).

3.7 CRONOGRAMA

Entre septiembre y diciembre de 2014 se llevó a cabo el diseño del estudio, fue sometido para su valoración por los Comités de Ética y presentado a los Centros de Salud candidatos a participar.

Los sujetos se reclutaron de forma sucesiva entre enero de 2015 y diciembre de 2016. Se prolongó la fase de recogida y procesamiento de muestras hasta febrero de 2017 solo para aquellos casos que habían requerido repetición del estudio. Durante este periodo se realizó un análisis preliminar trimestral de los datos que se comunicó periódicamente a los colaboradores de los Centros de Salud.

El análisis estadístico final y la escritura del texto se llevaron a cabo durante los años 2017 y 2018. La publicación de resultados preliminares y finales en congresos nacionales e internacionales, así como la elaboración del artículo y su publicación se realizó durante los años 2018 y 2019. El cronograma con las fases del estudio se resume en la Tabla 2.

Fase del trabajo	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Diseño del estudio						
Valoración por Comité de Ética						
Difusión del trabajo entre los Centros de Salud participantes						
Recogida y procesamiento de muestras						
Recogida de datos						
Análisis preliminar trimestral						
Análisis estadístico						
Escritura del texto						
Publicación de resultados						

Tabla 2: cronograma de trabajo.

4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.1 TAMAÑO MUESTRAL

Se calculó el tamaño muestral necesario con el software Epidat® 4.2, 2016 (Xunta de Galicia, España; Organización Panamericana de Salud OPS-OMS; Universidad CES, Colombia) para una población de referencia de 1200000 sujetos menores de 18 años en la Comunidad de Madrid. Se asumió una desviación estándar (DE) de CF esperada de 140 $\mu\text{g/g}$ en función de los resultados de estudios previos¹⁴⁴, y un intervalo de confianza del 95%. De este modo, se estimó un tamaño muestral de 383 sujetos para obtener una precisión de 14 $\mu\text{g/g}$.

Se establecieron ocho grupos etarios en base a las publicaciones previas sobre las diferencias de niveles de CF en distintas edades, ajustándose a los intervalos de edad definidos por el calendario de revisiones del niño sano y administración de vacunas de la Comunidad de Madrid^{59,195–197}. Para aumentar su homogeneidad, cada grupo etario debería contener un mínimo de 40 sujetos.

4.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos fueron analizados con el programa SPSS® Statistics versión 20. Se realizó la descripción del conjunto de la muestra y de los grupos etarios establecidos.

Se consideró que la posible distribución de valores extremos de CF (30 y ≥ 1000 $\mu\text{g/g}$) de forma irregular en los distintos grupos etarios podría alterar parcialmente los resultados. Por ello, se decidió realizar el análisis descriptivo de la variable cuantitativa “nivel de CF” ($\mu\text{g/g}$) en el total de la muestra y tras excluir a los sujetos con valores extremos ($\text{CF} \leq 30$ y ≥ 1000 $\mu\text{g/g}$). En ambos casos se analizó el conjunto de sujetos y por grupos etarios, mediante las medidas de centralización y de dispersión: media con intervalo de confianza y desviación típica, mediana con rango intercuartil; valores mínimo, máximo y rango entre ellos; y percentiles 5, 10, 25, 50, 75, 90 y 95.

Se analizó la normalidad de la muestra completa (395 voluntarios) aplicando el test de Kolmogorov-Smirnov (para muestras con $n > 30$), asumiendo la normalidad de la distribución en caso de que la significación bilateral del test fuera superior a 0.05. Ante el hallazgo de no normalidad (como se especifica más adelante), se utilizaron las pruebas no paramétricas correspondientes y se asumieron como mejores descriptores las medidas de centralización y dispersión basadas en ordenaciones (mediana, rango intercuartil y percentiles).

Se analizó la relación entre las variables edad, sexo, edad gestacional, modo de nacimiento, peso al nacimiento, tipo de lactancia, peso, talla, IMC, medicación recibida y asistencia a centro escolar con la variable CF.

La CF se consideró variable dependiente binaria, en función de que fuese alterada o normal según el punto de corte utilizado actualmente (> 50 $\mu\text{g/g}$ o ≤ 50 $\mu\text{g/g}$ respectivamente) o bien variable dependiente cuantitativa continua, considerando su valor en $\mu\text{g/g}$.

Se estudió la relación entre las variables independientes cuantitativas como la edad (días, meses), la talla (cm) o el peso (Kg) con la CF como variable dependiente binaria CF alterada ($>50 \mu\text{g/g}$) o normal ($\leq 50 \mu\text{g/g}$) mediante regresión logística. La relación con la CF ($\mu\text{g/g}$) como variable dependiente cuantitativa se analizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Para el análisis de los datos antropométricos, se calculó la desviación estándar (DE) de peso, talla e IMC de cada participante según las tablas de Carrascosa *et al.* (2010) a través de la aplicación nutricional de la Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica, SEGHP (https://www.seghnp.org/nutricional/).

Se estudió la influencia de las variables independientes binarias como el sexo (hombre o mujer) o el tipo de nacimiento (vaginal o cesárea) con la variable dependiente binaria CF alterada ($>50 \mu\text{g/g}$) o normal ($\leq 50 \mu\text{g/g}$) mediante el test de Chi-cuadrado (X^2) de Pearson o el test exacto de Fisher según correspondiera. La relación con la variable dependiente cuantitativa concentración de CF ($\mu\text{g/g}$) se analizó mediante la *t* de Student o la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney en función de la normalidad de la distribución.

Para valorar la posible relación de las variables independientes categóricas no binarias como la edad gestacional (dividiendo a los sujetos en las categorías pretérmino, a término o postérmino) con la variable dependiente binaria CF alterada ($>50 \mu\text{g/g}$) o normal ($\leq 50 \mu\text{g/g}$) se aplicó la prueba de Chi-cuadrado (X^2) de Pearson o el test exacto de Fisher según correspondiera. Para estudiar la concentración de CF ($\mu\text{g/g}$) como variable dependiente cuantitativa continua se aplicó la prueba de ANOVA si cumplían la normalidad o la prueba de Kruskal-Wallis si no la cumplían.

En el análisis de la relación entre los datos antropométricos y la CF, con el objetivo de corregir la edad como posible factor de confusión se llevó a cabo un análisis multivariante *post hoc*. En caso de obtenerse un coeficiente mayor del 10% respecto al del análisis univariante, se asumió como correcta la significación hallada en el análisis

multivariante para cada supuesto. Además, se utilizó la prueba de Scheffé para comparaciones múltiples en el análisis *post hoc* cuando correspondiera.

Los contrastes de hipótesis fueron bilaterales y con un nivel de significación de 0.05. Los datos numéricos se aportan en tablas, y se representaron en histogramas, diagramas de caja o gráficos de dispersión según correspondiera.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIPCIÓN DE LOS SUJETOS ESTUDIADOS

Se incluyeron 395 sujetos (204 niños y 191 niñas)

Edad: media de 4.17 años, rango 3 días a 16 años y 11 meses

Modo nacimiento: 293 parto, 98 cesárea

Edad gestacional: media 38.7 semanas (344 a término, 34 pretérmino)

Peso al nacimiento: media 3.2 Kg, mediana 3.2 Kg

Peso: media 18 kg, mediana 11.8 kg

Talla: media 94.2 cm, mediana 85.0 cm

IMC: media 16.4 kg/m², mediana 16.3 kg/m²

Centro escolar: 157 sujetos asisten a colegio/instituto, 52 a guardería, 186 a ninguno

5.1.1 NÚMERO DE VOLUNTARIOS INCLUIDOS, EDAD Y GÉNERO

Desde el 1 de enero de 2015 hasta el 30 de diciembre de 2016 se reclutaron 426 sujetos. Se descartaron inicialmente 43 por cumplir alguno de los criterios de exclusión. De estos, se consiguió reincluir en un segundo tiempo a 12 participantes, tal y como se refleja en la Figura 11. Los criterios de exclusión y las características de dichos sujetos se describen en el apartado de anexos.

Resultados

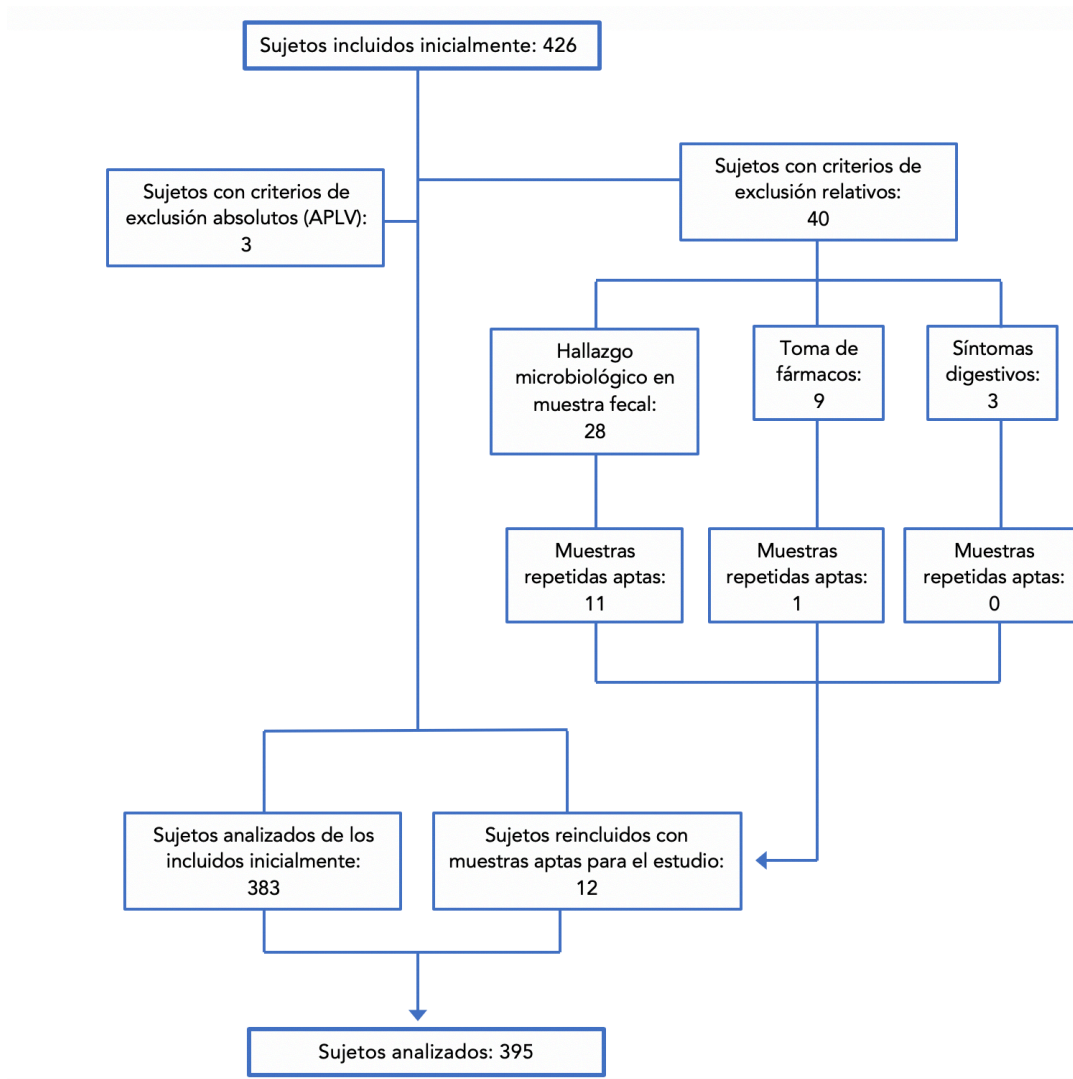


Figura 11: sujetos incluidos inicialmente, excluidos y reincluidos para el estudio.

Se analizaron finalmente un total de 395 muestras de niños de edades comprendidas entre los 3 días y los 16 años y 11 meses, con una edad media de 4.17 años (IC 95% de 3.7- 4.6 años, DE 4.7) y una mediana de 2 años (RIC 6.5 años). De ellos, 204 fueron niños (51.6%) y 191 niñas (48.4%). La gran mayoría de los voluntarios (392, un 99.2% de la muestra) vivían en la ciudad de Madrid. Tan solo 3 participantes vivían en otro municipio de la Comunidad de Madrid. Se aplicó la distribución por grupos etarios que aparece en la tabla 3.

Resultados

Grupo de edad	Número de sujetos totales (N)	Porcentaje del total de sujetos
<1 mes	43	10.9%
1-5 meses	64	16.2%
6-11 meses	46	11.7%
12-23 meses	42	10.6%
2-3 años	45	11.4%
4-7 años	64	16.2%
8-11 años	46	11.7%
12-18 años	45	11.4%
Total (de 0 a 18 años)	395	100%

Tabla 3: distribución de sujetos por grupos etarios, y porcentaje de sujetos en cada grupo respecto al número total de participantes en el estudio (395).

5.1.2 FACTORES PERINATALES

El tipo de nacimiento y la edad gestacional se registró en 391 voluntarios (99% del total de la muestra). El nacimiento se produjo por vía vaginal en 293 participantes (74.9%) y mediante cesárea en 98 (25.1%). De los 391 sujetos, 344 (88%) habían nacido a término, 34 (8.7%) fueron pretérmino y 13 (3.3%) fueron postérmino. La edad gestacional media fue de 38.7 semanas (IC 95% de 38.4-39 semanas, DE 2.9), con una mediana de 39 semanas (RIC 2 semanas). Se obtuvo el peso al nacimiento en 392 participantes del total (99.2%). El peso mínimo fue de 750 gr y el máximo de 4.910 Kg, con un rango de 4.160 Kg. La media fue de 3.2 Kg (IC 95% de 3.1- 3.2 Kg, DE 0.6), y la mediana fue de 3.2 Kg (RIC 0.7 Kg).

5.1.3 LACTANCIA

Se estudió el tipo de alimentación recibida solo en los voluntarios menores de 6 meses, dada la menor variabilidad del parámetro en este grupo de edad, con solo 3 opciones: lactancia materna exclusiva, fórmula de inicio de forma exclusiva o lactancia

mixta.

Se recogió esta información en 104 de los 107 sujetos (97.2%). Recibían lactancia materna exclusiva 69 lactantes (el 66.4%), lactancia mixta 9 lactantes (el 8.7%) y fórmula de inicio de forma exclusiva 26 lactantes (el 25%).

5.1.4 DATOS ANTROPOMÉTRICOS

El peso se registró en 389 sujetos (98.7% de la muestra). El mínimo fue de 2.2 Kg, el máximo de 73 Kg, con un rango de 70.8 Kg. El peso medio fue de 18 Kg (IC 95% de 16.4- 19.6 Kg, DE 16), con una mediana de 11.8 Kg (RIC 18.1 Kg).

La talla constaba en 383 sujetos (97% del total de la muestra). El mínimo fue de 46 y el máximo de 185 cm, con un rango de 139 cm. La talla media fue de 94.2 cm (IC 95% de 90.4- 98 cm, DE 0.4). La mediana fue de 85 cm (RIC 61 cm).

Con los datos previos, se calculó el índice de masa corporal (IMC) en 382 sujetos (96.7% de la muestra). El IMC mínimo fue de 10.2 Kg/m², el máximo de 25.4 Kg/m², con un rango de 15.2 Kg/m². El IMC medio fue de 16.4 Kg/m² (IC 95% de 16.2- 16.7 Kg, DE 2.6), con una mediana de 16.3 Kg/m² (RIC 3.1 Kg/m²).

5.1.5 MEDICACIÓN RECIBIDA ANTES DEL ESTUDIO

Se registró en todos los participantes la medicación recibida en los 15 días previos a la recogida de la muestra. La toma de algunos fármacos en este periodo supuso un criterio de exclusión, tal y como se explica en el apartado correspondiente. Se dividió a los 395 voluntarios (100% de la muestra) en 3 categorías: sujetos que no habían recibido ninguna mediación (348, 88.1%), los que habían recibido vitamina D (32, 8.1%) y los que habían recibido otra medicación (15, 3.8%), como antihistamínicos, laxantes tipo polietilenglicol 3350 con electrolitos, paracetamol, salbutamol y

budesonida inhalados entre otros.

5.1.6 ASISTENCIA A CENTRO ESCOLAR

El grupo más numeroso no asistía a guardería ni colegio o instituto en el momento de la realización del estudio (186 participantes, 47.1%), 157 acudían al colegio o instituto (39.7%) y 52 a guardería (13.2%).

5.1.7 SUJETOS CON CF ≥ 1000 MCG/G

Se identificaron un total de 8 sujetos con CF igual o superior a 1000 $\mu\text{g/g}$. De ellos, 7 eran menores de 6 meses en el momento de la recogida de la muestra, y 5 de ellos recibían en aquel momento LM exclusiva, como puede verse en la Tabla 4.

Se contactó por vía telefónica con los familiares de los 8 participantes para requerir una segunda muestra de heces que entregaron 5 sujetos. De ellos, cuatro proporcionaron la muestra entre 1 y 3 meses tras la primera determinación, y uno a los 5 meses. En todos los casos el valor obtenido fue inferior al primero. Uno de los participantes refirió haber repetido la determinación de CF en otro centro siendo esta inferior a la primera.

Además, se consiguió contactar con 6 de los 8 sujetos transcurrido un periodo mínimo de 2 años y todos ellos refirieron seguir asintomáticos, mantener un adecuado desarrollo ponderoestatural y no haber sido diagnosticados de enfermedades gastrointestinales incluyendo alergias o intolerancias digestivas. En el último control telefónico, uno de ellos estaba siendo estudiado por antecedente de déficit de alfa-1-antitripsina en su padre, sin disponer de resultados definitivos.

Resultados

Sujetos con CF ≥ 1000 $\mu\text{g/g}$	Edad en el momento del estudio	Sexo	Tipo de lactancia menores de 6 meses	CF en segunda determinación (tiempo transcurrido)	Edad en el momento de la llamada de control
1	17 días	Hombre	LM	207 $\mu\text{g/g}$ (3 meses)	4 años y 23 meses
2	2 meses y 15 días	Hombre	LM	referido inferior (2 meses)	2 años y 11 meses
3	1 mes y 1 día	Hombre	LM	423 $\mu\text{g/g}$ (3 meses)	NA
4	1 mes y 17 días	Mujer	LM	353 $\mu\text{g/g}$ (2 meses)	3 años y 9 meses
5	2 meses y 12 días	Mujer	LM	169 $\mu\text{g/g}$ (2 meses)	3 años y 8 meses
6*	1 mes y 11 días	Mujer	Lactancia mixta	NA	3 años y 3 meses
7	1 mes y 1 día	Mujer	LM	308 $\mu\text{g/g}$ (5 meses)	3 años y 1 mes
8	8 años y 9 meses	Hombre	NA	NA	NA

Tabla 4: participantes con valores de CF ≥ 1000 $\mu\text{g/g}$. Seguimiento con llamada de control tras un periodo mínimo de 2 años después del estudio. LM: lactancia materna (exclusiva). NA: no aplica.*: sujeto estudiado por antecedente de déficit de alfa-1-antitripsina en el padre, sin resultados definitivos.

5.2 NIVELES DE CF EN EL CONJUNTO DE LA MUESTRA

La mediana de CF en los 395 sujetos fue de 77 $\mu\text{g/g}$, RIC 246.

La mediana de CF en los 294 sujetos (sin valores extremos) fue de 143.5 $\mu\text{g/g}$, RIC 249.

Se objetivó que la distribución de los datos extremos, etiquetados como CF ≤ 30 o ≥ 1000 $\mu\text{g/g}$, no fue homogénea por grupos de edad, como se muestra en la Tabla 5. Se observó un predominio de sujetos con valores extremos superiores (CF ≥ 1000 $\mu\text{g/g}$) en los grupos de menor edad, y una mayor frecuencia de valores extremos inferiores (CF ≤ 30 $\mu\text{g/g}$) en los grupos de mayor edad.

Grupo de edad	Número de sujetos totales (N)	Sujetos con CF ≤ 30 $\mu\text{g/g}$	Sujetos con CF ≥ 1000 $\mu\text{g/g}$	Número de sujetos excluyendo valores extremos
<1 mes	43	3	1	39
1-5 meses	64	2	6	56
6-11 meses	46	10	0	36
12-23 meses	42	7	0	35
2-3 años	45	8	0	37
4-7 años	64	19	0	45
8-11 años	46	20	1	25
12-18 años	45	24	0	21
Total (de 0 a 18 años)	395	88	8	294

Tabla 5: distribución de sujetos con valores extremos por grupos de edades, y número total de sujetos en cada grupo de edad con y sin los valores extremos.

Por ello, se decidió realizar la descripción de los valores de CF mediante las medidas de centralización y de dispersión tanto en el total de la muestra como excluyendo dichos datos extremos. El resto del estudio estadístico (estudio de la

Resultados

posible relación de los niveles de CF con otras variables) se llevó a cabo con el conjunto de todos los datos.

Considerando la totalidad de las muestras se obtuvo un valor medio de CF para todas las edades de 191.6 µg/g, y una mediana de 77 µg/g. Los valores mínimo y máximo vinieron definidos por el rango de detección de la prueba empleada (30 y 1000 µg/g respectivamente, rango de 970).

Una vez eliminados los valores extremos ($CF \leq 30$ y ≥ 1000 µg/g) se obtuvo un valor medio de CF de 220.7 µg/g, y una mediana de 143.5 µg/g. En este caso, los valores mínimo y máximo son de 31 y 993 µg/g respectivamente, con un rango de 962. En la Tabla 6 se muestran los datos de tendencia central y dispersión de la CF en toda la muestra y tras eliminar a los sujetos con estos valores extremos.

Variable	Sujetos de 0 a 18 años (incluyendo valores extremos)	Sujetos de 0 a 18 años (excluyendo valores extremos)
Número de sujetos	395	294
CF media (µg/g)	191.6	220.7
IC al 95%	168.6 214.6	196.1 245.3
Media recortada al 5%	159.9	196.4
Mediana (µg/g)	77	143.5
Varianza	54224.4	45932.1
Desviación típica (µg/g)	232.9	214.3
Mínimo (µg/g)	30	31
Máximo (µg/g)	1000	993
Rango	970	962
Amplitud intercuartil	246	249
Asimetría	1.9	1,5
Curtosis	3.1	1,9
Percentil 5 (µg/g)	30	34
Percentil 10 (µg/g)	30	39
Percentil 25 (µg/g)	32	56
Percentil 50 (µg/g)	77	143.5
Percentil 75 (µg/g)	278	305
Percentil 90 (µg/g)	508.4	533
Percentil 95 (µg/g)	797.6	704

Tabla 6: valores de tendencia central y dispersión del nivel de CF (µg/g) en el total de sujetos de la muestra incluyendo y excluyendo los datos extremos. IC: intervalo de confianza.

Resultados

En las Figuras 12 y 13 se representa la distribución de los valores de CF en toda la muestra con y sin valores extremos en forma de histograma. En las Figuras 14 y 15 se representan como diagrama de caja.

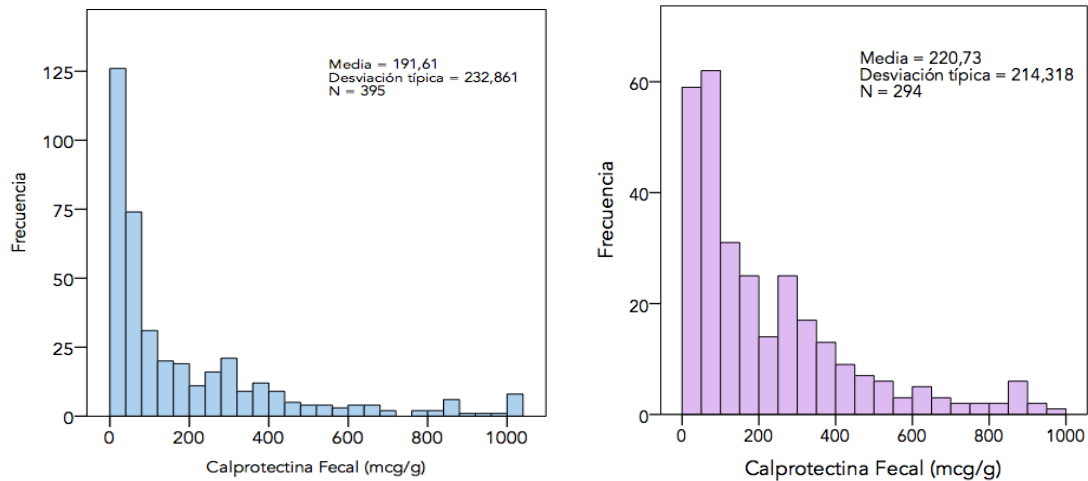


Figura 12 y Figura 13: histograma con la distribución de los valores de CF ($\mu\text{g/g}$) en toda la muestra (395 participantes) y tras excluir los valores extremos (294 participantes).

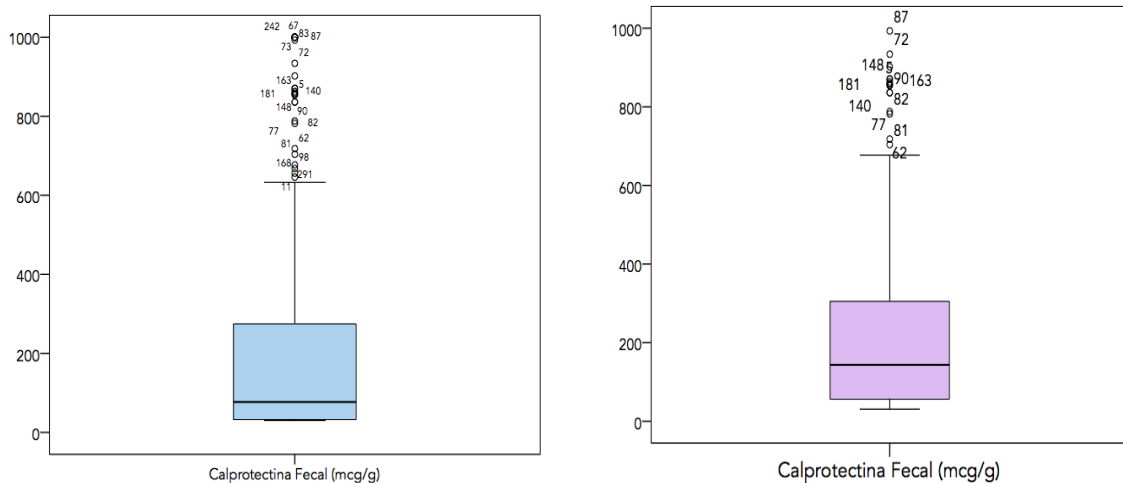


Figura 14 y Figura 15: diagrama de caja con la distribución de los valores de CF ($\mu\text{g/g}$) en toda la muestra (395 participantes) y tras excluir los valores extremos (294 participantes).

Resultados

El test de Kolmogorov-Smirnov confirmó la ausencia de normalidad de la muestra completa (395 voluntarios) [(Valor =0.244, gl =395, sig.=0.00 ($p < 0.05$))], por lo que se utilizaron para el resto del análisis pruebas no paramétricas y se identificaron como mejores medidas de centralización y de dispersión los índices basados en ordenaciones (mediana y amplitud intercuartil).

5.3 NIVELES DE CF POR GRUPOS ETARIOS

Se estudió el nivel de CF en cada grupo etario, según la distribución que consta en la Tabla 3. Dada la llamativa frecuencia de niveles muy altos de CF en los niños de menor edad, y las peculiaridades de estos grupos del tipo de alimentación, la flora intestinal u otros factores que podían influir en los niveles de CF, se analizó como grupo independiente a los lactantes menores de 12 meses.

5.3.1 SUJETOS MENORES DE 1 AÑO

En el total de participantes menores de 1 año, existe una correlación negativa estadísticamente significativa entre la edad (días) y la CF ($\mu\text{g/g}$).

Se analizaron un total de 153 sujetos, con edades entre 3 y 358 días (rango 355 días). La edad media fue de 108.9 días (IC 95% de 93.1- 124.8 días, DE 99.5), con una mediana de 67 días (RIC 173 días). El 56.2% (86) eran niños, con un 43.8% (67) de niñas.

Los niveles de CF presentaron un valor mínimo de 30 y un valor máximo de 1000 $\mu\text{g/g}$ (rango 970 $\mu\text{g/g}$). Se obtuvo un valor medio de CF de 324.6 $\mu\text{g/g}$ (IC 95% de 280.6– 368.5 $\mu\text{g/g}$, DE 275.2). La mediana para este grupo de edad fue de 282 $\mu\text{g/g}$ (RIC 263 $\mu\text{g/g}$).

El test de Kolmogorov-Smirnov (con la corrección de la significación de Lilliefors), con una significación de 0.00 ($p < 0.05$), indicó la ausencia de normalidad de la distribución. Por ello, se aplicaron test no paramétricos. La representación gráfica de estos datos se muestra en la Figura 16 y la Figura 17.

Resultados

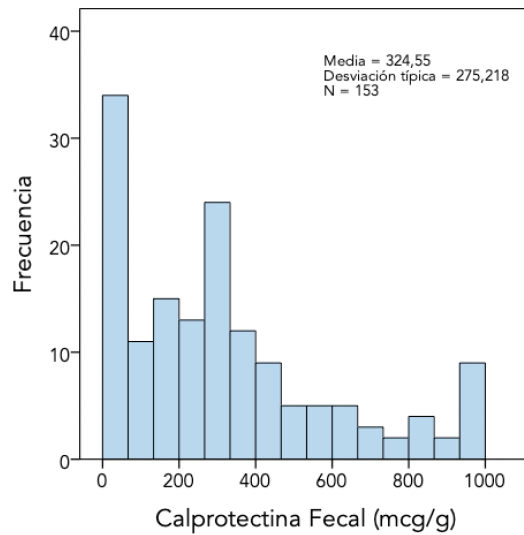


Figura 16: histograma con la distribución de los valores de CF ($\mu\text{g/g}$) en el grupo de menores de 12 meses de edad (153 sujetos).

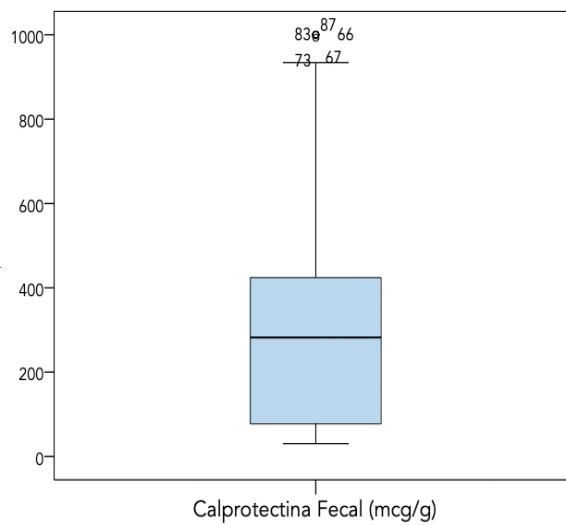


Figura 17: diagrama de caja con la distribución de los valores de CF ($\mu\text{g/g}$) en el grupo de menores de 12 meses de edad (153 sujetos).

Se analizaron los valores de tendencia central y dispersión del nivel de CF ($\mu\text{g/g}$) en los menores de 1 año divididos en los subgrupos de edad mencionados (< 1 mes, de 1 a 5 meses y de 6 a 11 meses) y se obtuvieron los resultados expuestos en la Tabla

Resultados

7. Se realizó el mismo análisis una vez excluidos los casos con valores de CF extremos (CF ≤ 30 $\mu\text{g/g}$ o ≥ 1000 $\mu\text{g/g}$), con los resultados de que aparecen en la Tabla 8.

Variable	Edad <1 mes	Edad 1-5 meses	Edad 6-11 meses
Número de sujetos	43	64	46
CF media ($\mu\text{g/g}$)	344.3	424	167.7
IC al 95%	278.2	350.9	99.2
	410.5	497.1	236.3
Media recortada al 5%	329.3	413.4	136.2
Mediana ($\mu\text{g/g}$)	303	325.5	63
Varianza	46219.6	85629.5	53252.3
Desviación típica ($\mu\text{g/g}$)	215	292.6	230.8
Mínimo ($\mu\text{g/g}$)	30	30	30
Máximo ($\mu\text{g/g}$)	1000	1000	902
Rango	970	970	872
Amplitud intercuartil	202	375	126
Asimetría	1.2	0.7	2.2
Curtosis	1.9	-0.5	3.8
Percentil 5 ($\mu\text{g/g}$)	30	56	30
Percentil 10 ($\mu\text{g/g}$)	156	76	30
Percentil 25 ($\mu\text{g/g}$)	221	229	33
Percentil 50 ($\mu\text{g/g}$)	303	325.5	63
Percentil 75 ($\mu\text{g/g}$)	423	603.5	159
Percentil 90 ($\mu\text{g/g}$)	620	993	488
Percentil 95 ($\mu\text{g/g}$)	859	1000	836

Tabla 7: valores de tendencia central y dispersión del nivel de CF ($\mu\text{g/g}$) en el total de sujetos menores de un año, por subgrupos de edad, incluyendo los datos extremos. IC: intervalo de confianza.

Variable	Edad <1 mes	Edad 1-5 meses	Edad 6-11 meses
Número de sujetos	39	56	36
CF media ($\mu\text{g/g}$)	351.7	376.3	206
IC al 95%	293.8	314.2	122
	409.6	438.5	289.9
Media recortada al 5%	337.5	363.6	178.2
Mediana ($\mu\text{g/g}$)	305	315	83
Varianza	31915.7	53933.2	61543.1
Desviación típica ($\mu\text{g/g}$)	178.7	232.2	248.1
Mínimo ($\mu\text{g/g}$)	34	52	31
Máximo ($\mu\text{g/g}$)	870	993	902

Resultados

Rango	836	941	871
Amplitud intercuartil	190	308	205
Asimetría	1.3	0.8	1.8
Curtosis	2	0.1	2.3
Percentil 5 ($\mu\text{g/g}$)	156	59	33
Percentil 10 ($\mu\text{g/g}$)	166	77	39
Percentil 25 ($\mu\text{g/g}$)	233	229	53
Percentil 50 ($\mu\text{g/g}$)	305	315	83
Percentil 75 ($\mu\text{g/g}$)	423	536.5	258
Percentil 90 ($\mu\text{g/g}$)	620	718	631
Percentil 95 ($\mu\text{g/g}$)	859	836	854

Tabla 8: valores de tendencia central y dispersión del nivel de CF ($\mu\text{g/g}$) en el total de sujetos menores de un año, por subgrupos de edad, excluyendo los datos extremos. IC: intervalo de confianza.

Para valorar la normalidad de la distribución, se aplicó en cada subgrupo de edad la prueba de Kolmogorov-Smirnov (con la corrección de la significación de Lilliefors). Se obtuvo en todos los grupos $p < 0.05$, lo que indicó la no normalidad de la distribución, por lo que para el estudio de asociación con otras variables se aplicaron pruebas no paramétricas.

5.3.2 SUJETOS MAYORES DE UN AÑO

En los sujetos mayores de 1 año, se observó la disminución de los parámetros de tendencia central (mediana, moda etc.) de CF a medida que aumentaba la edad.

Se analizaron los valores de tendencia central y dispersión del nivel de CF ($\mu\text{g/g}$) en los participantes mayores de un año, divididos por los subgrupos de edad ya mencionados (de 12 a 23 meses, de 2 a 3 años, de 4 a 7 años, de 8 a 11 años y de 12 a 18 años), con lo que se obtuvieron los resultados expuestos en la Tabla 9. Se

Resultados

excluyeron posteriormente los casos con valores de CF extremos ($CF \leq 30 \mu\text{g/g}$ o $\geq 1000 \mu\text{g/g}$) y se realizó el mismo análisis con los resultados que aparecen en la Tabla 10.

Variable	Edad 12-23 meses	Edad 2-3 años	Edad 4-7 años	Edad 8-11 años	Edad 12-18 años
Número de sujetos	42	45	64	46	45
CF media ($\mu\text{g/g}$)	217.7	116.1	89.1	85.4	45.2
IC al 95%	142.7	84	63.2	38.9	35.2
	292.8	148.1	114.9	131.9	55.2
Media recortada al 5%	192.1	104.5	72.5	56.2	39
Mediana ($\mu\text{g/g}$)	97	71	46	34.5	30
Varianza	58009.8	11389.1	10706.5	24506.8	1102.3
Desviación típica ($\mu\text{g/g}$)	240.9	106.7	103.5	156.5	33.2
Mínimo ($\mu\text{g/g}$)	30	30	30	30	30
Máximo ($\mu\text{g/g}$)	871	432	677	1000	183
Rango	841	402	647	970	153
Amplitud intercuartil	275	130	89	48	19
Asimetría	1.6	1.4	3.6	5	3.4
Curtosis	1.8	1.4	16.8	27.3	12.4
Percentil 5 ($\mu\text{g/g}$)	30	30	30	30	30
Percentil 10 ($\mu\text{g/g}$)	30	30	30	30	30
Percentil 25 ($\mu\text{g/g}$)	57	37	30	30	30
Percentil 50 ($\mu\text{g/g}$)	97	71	46	34.5	30
Percentil 75 ($\mu\text{g/g}$)	332	167	118.5	78	49
Percentil 90 ($\mu\text{g/g}$)	533	271	163	143	75
Percentil 95 ($\mu\text{g/g}$)	856	344	284	245	84

Tabla 9: valores de tendencia central y dispersión del nivel de CF ($\mu\text{g/g}$) en el total de sujetos mayores de un año, por subgrupos de edad, incluyendo los datos extremos. IC: intervalo de confianza.

Variable	Edad 12-23 meses	Edad 2-3 años	Edad 4-7 años	Edad 8-11 años	Edad 12-18 años
Número de sujetos	35	37	45	25	21
CF media ($\mu\text{g/g}$)	255.3	134.7	114	93.1	62.6
IC al 95%	170.2	98.3	79.5	55.1	43.1
	340.3	171.1	148.5	131.1	82.1
Media recortada al 5%	233	124.5	96.9	78.5	57.6
Mediana ($\mu\text{g/g}$)	145	103	90	50	50

Resultados

Varianza	61247.5	11918	13186.3	8476.7	1831
Desviación típica (µg/g)	247.5	109.2	114.8	92.1	42.8
Mínimo (µg/g)	42	33	31	31	32
Máximo (µg/g)	871	432	677	461	183
Rango	829	399	646	430	151
Amplitud intercuartil	315	153	95	66	28
Asimetría	1.4	1.2	3.2	3	2.4
Curtosis	1.1	0.8	13	10.7	5.1
Percentil 5 (µg/g)	46	33	34	33	32
Percentil 10 (µg/g)	57	37	36	34	33
Percentil 25 (µg/g)	67	46	43	39	38
Percentil 50 (µg/g)	145	103	90	50	50
Percentil 75 (µg/g)	382	199	138	105	66
Percentil 90 (µg/g)	656	303	182	148	84
Percentil 95 (µg/g)	863	404	317	245	183

Tabla 10: valores de tendencia central y dispersión del nivel de CF (µg/g) en el total de sujetos mayores de un año, por subgrupos de edad, eliminando los datos extremos. IC: intervalo de confianza.

Para valorar la normalidad de la distribución, se aplicó en cada subgrupo el test de Kolmogorov-Smirnov (con la corrección de la significación de Lilliefors). Se obtuvo en todos los grupos $p < 0.05$, lo que indica la no normalidad de la distribución. Por ello, para estudiar la posible asociación de la CF con otras variables se aplicaron en todos los grupos etarios pruebas no paramétricas.

Como resumen, en las Figuras 18 y 19 se representan los valores de CF media (µg/g) en toda la muestra (395 participantes) divididos en grupos etarios y tras excluir los valores extremos ($CF \leq 30 \mu\text{g/g}$ y $\geq 1000 \mu\text{g/g}$).

Resultados

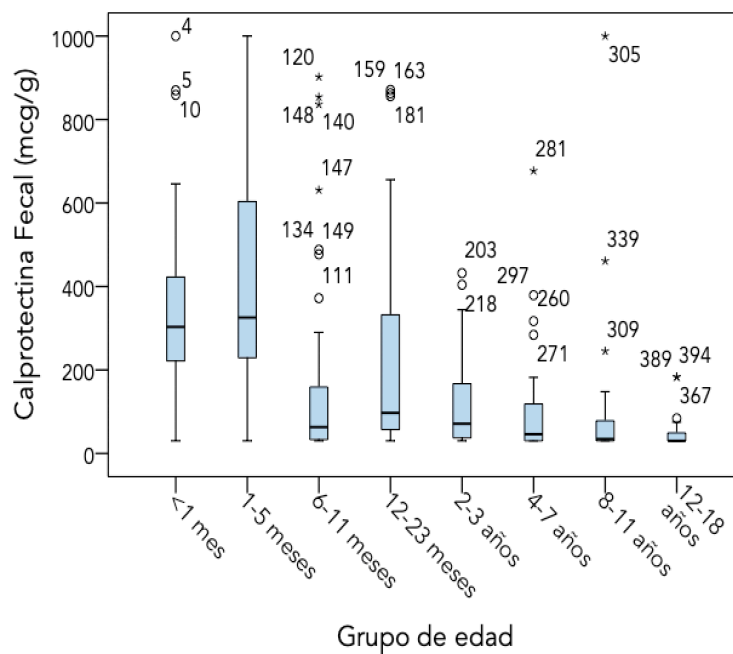


Figura 18: diagrama de cajas con la distribución de los valores de CF ($\mu\text{g/g}$) por grupos de edad en toda la muestra (395 sujetos).

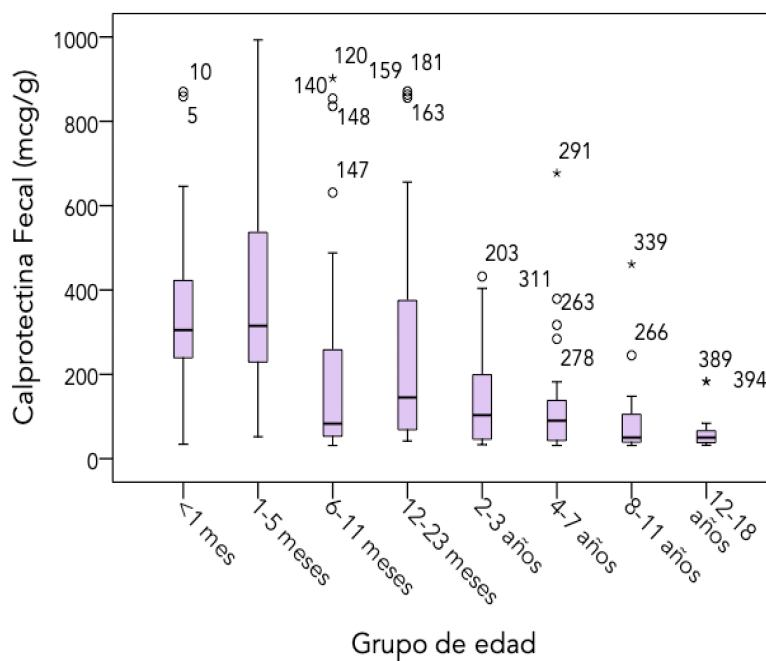


Figura 19: diagrama de cajas con la distribución de los valores de CF ($\mu\text{g/g}$) por grupos de edad tras excluir los valores extremos (294 sujetos).

5.4 CORRELACIÓN ENTRE LA EDAD Y EL NIVEL DE CF

Se objetivó una relación lineal negativa estadísticamente significativa entre la variable edad (días) y la variable CF ($\mu\text{g/g}$) en el total de la muestra.

Se valoró la posible asociación de la edad con la variable dependiente binaria CF normal ($\leq 50 \mu\text{g/g}$) o alterada ($> 50 \mu\text{g/g}$) mediante regresión logística. Se obtuvo una *odds ratio* (OR) de 0.981 con un IC al 95% de 0.976-0.985 con un nivel de significación por la prueba de Wald de 0.00 ($p < 0.05$), lo que sugiere una relación negativa entre ambas variables. Sin embargo, no se encontró esta relación en ninguno de los grupos etarios por separado.

Se estudió la existencia de una posible correlación entre la variable independiente cuantitativa edad (días) y la variable dependiente cuantitativa CF ($\mu\text{g/g}$) mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Se obtuvo un valor de -0.603, con una significación bilateral de 0.00 ($p < 0.05$), lo que indicó la existencia de una correlación negativa fuerte entre ambas variables ($-1 < r < 0$). En la Figura 20 se observa la dirección negativa de la relación entre las variables.

Resultados

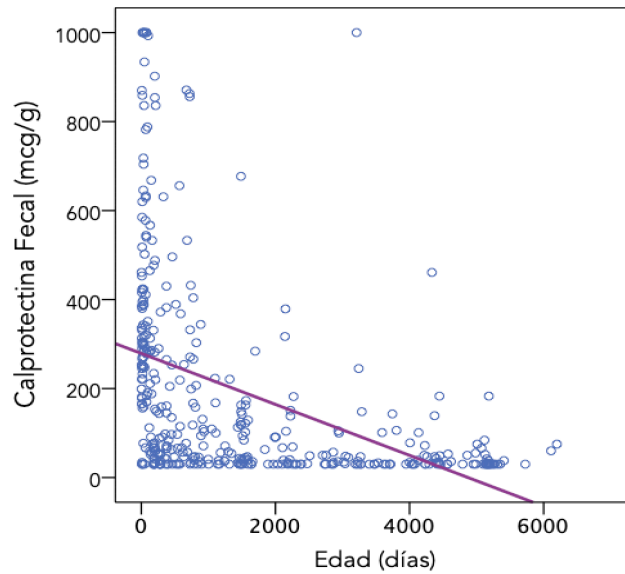


Figura 20: gráfico de dispersión de la variable dependiente CF ($\mu\text{g/g}$) respecto a la variable independiente edad (días) en toda la muestra (395 participantes).

Por las características peculiares de los menores de 12 meses, se estudió en ellos, por separado, la posible correlación entre la edad (días) y la CF ($\mu\text{g/g}$). Se obtuvo un coeficiente de correlación de Spearman de -0.383 significativo de 0.00 ($p < 0.05$), lo que indica una correlación negativa ($-1 < r < 0$), como se representa en la Figura 21.

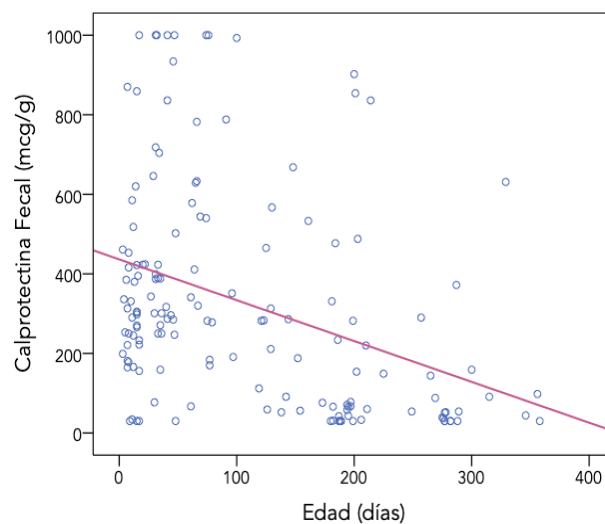


Figura 21: gráfico de dispersión de la variable dependiente CF ($\mu\text{g/g}$) respecto a la variable predictora edad (días) en el grupo de sujetos menores de 12 meses (153 sujetos).

5.5 CORRELACIÓN ENTRE EL SEXO Y EL NIVEL DE CF

No se objetivó relación entre el sexo y la CF.

Se estudió la asociación entre el sexo y el nivel CF, en los 204 niños (51.6%) y las 191 niñas (48.4%). Se analizó en cada grupo si presentaban un nivel de CF alterado ($>50 \mu\text{g/g}$) o normal ($\leq 50 \mu\text{g/g}$). Se estudió además el nivel de CF como variable cuantitativa en $\mu\text{g/g}$ para cada categoría. Los resultados aparecen en la Tabla 11.

Sexo del sujeto (número de sujetos)	CF $>50 \mu\text{g/g}$ Recuento (% del grupo)	CF $\leq 50 \mu\text{g/g}$ Recuento (% del grupo)	CF media (IC 95%) DE $\mu\text{g/g}$	CF mediana (RIC) $\mu\text{g/g}$
Niños (204)	129 (63.2%)	75 (36.8%)	196.8 (164.1-229.5) 236.9	86 (251)
Niñas (191)	110 (57.6%)	81 (42.4%)	186 (153.4-218.7) 228.9	71 (223)

Tabla 11: sexo del sujeto, niveles de CF alterados ($>50 \mu\text{g/g}$) o normales ($\leq 50 \mu\text{g/g}$) y media y mediana de CF ($\mu\text{g/g}$) para cada categoría, en los 395 participantes (100% de la muestra). IC: intervalo de confianza. DE: desviación estándar. RIC: rango intercuartílico.

Para el análisis de la variable dependiente como binaria (CF alterada o no), se aplicó la prueba de Chi-cuadrado de Pearson y no se encontraron diferencias significativas [$X^2 = 1.315$, $gl = 1$, $p = 0.252$ ($p > 0.05$)]. Tampoco se encontraron diferencias en ninguno de los grupos etarios por separado al aplicar las pruebas de Chi-cuadrado o de Fisher según correspondiera (p en todos ellos > 0.05).

Se estudió la posible asociación del sexo con el nivel de CF como variable dependiente cuantitativa continua ($\mu\text{g/g}$). Los datos aparecen Tabla 11, y su

Resultados

representación gráfica mediante el diagrama de cajas de la Figura 22. Se analizó con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, con un valor de 0.54 ($p > 0.05$), lo que sugiere la ausencia de diferencias significativas entre ambos sexos. Tampoco se encontraron diferencias al analizar este dato en los distintos grupos etarios.

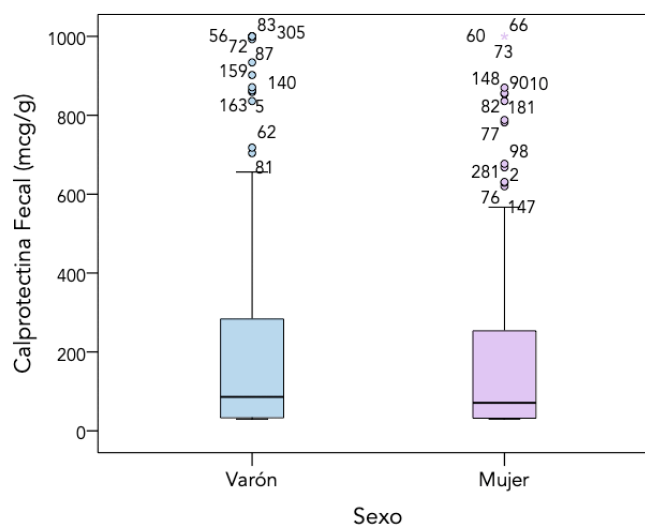


Figura 22: diagrama de cajas con las variables sexo (204 niños y 191 niñas) y CF ($\mu\text{g/g}$) en toda la muestra, de 0 a 18 años (395 sujetos en total).

5.6 CORRELACIÓN ENTRE LOS FACTORES PERINATALES Y EL NIVEL DE CF

5.6.1 LA EDAD GESTACIONAL

No se objetivó relación entre la edad gestacional y la CF.

Se analizó la posible relación entre la edad gestacional y la CF alterada (>50 $\mu\text{g/g}$) o normal (≤ 50 $\mu\text{g/g}$), así como con el nivel de CF como variable cuantitativa en $\mu\text{g/g}$, en 391 participantes (99% del total de la muestra) de 0 a 18 años.

Para ello, se dividió a los sujetos en 3 categorías según hubieran nacido antes de la semana 37 de gestación (pretérmino), entre la semana 37 y 41+6 (a término) y desde la semana 42 (postérmino). Los resultados aparecen en la Tabla 12.

Edad gestacional número de sujetos (% del total)	CF >50 $\mu\text{g/g}$ Recuento (% del grupo)	CF ≤ 50 $\mu\text{g/g}$ Recuento (% del grupo)	CF media (IC 95%) DE $\mu\text{g/g}$	CF mediana (RIC) $\mu\text{g/g}$
Pretérmino (<37 SG) 34 (8.70%)	17 (50.0%)	17 (50.0%)	181.7 (89.3-274.1) 264.9	50.5 (146)
A término (37 a 41+6 SG) 344 (87.98%)	213 (61.9%)	131 (38.1%)	191 (167.1-214.9) 225	81 (249)
Postérmino (>42 SG) 13 (3.32%)	5 (38.5%)	8 (61.5%)	140 (1.1-278.9) 229.8	42 (116)

Tabla 12: edad gestacional (niños nacidos pretérmino, a término y postérmino) y niveles de CF alterados (>50 $\mu\text{g/g}$) o normales (≤ 50 $\mu\text{g/g}$), así como media y mediana de CF en $\mu\text{g/g}$. SG: semanas de gestación. IC: intervalo de confianza. DE: desviación estándar. RIC: rango intercuartílico.

Resultados

No se encontraron diferencias en la proporción de niños con CF alterada (>50 $\mu\text{g/g}$) vs normal (≤ 50 $\mu\text{g/g}$) en estos 3 grupos de sujetos con la prueba Chi-cuadrado de Pearson [$X^2=4.459$, $gl=2$, $p=0.108$ ($p>0.05$)]. Tampoco se encontraron diferencias al estudiar los distintos grupos de edad, utilizando la prueba de Chi-Cuadrado o la de Fisher según correspondiera (p en todos >0.05).

Se estudió la relación con la CF como variable dependiente cuantitativa ($\mu\text{g/g}$) en las 3 categorías en 391 sujetos (99% del total de la muestra) de 0 a 18 años. Para ello, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con la que se obtuvo una significación de 0.194 ($p>0.05$), lo que indica la ausencia de diferencias significativas. En la Figura 23 aparece la representación gráfica. Se realizó esta misma operación en cada grupo etario sin encontrarse diferencias en ninguno de ellos.

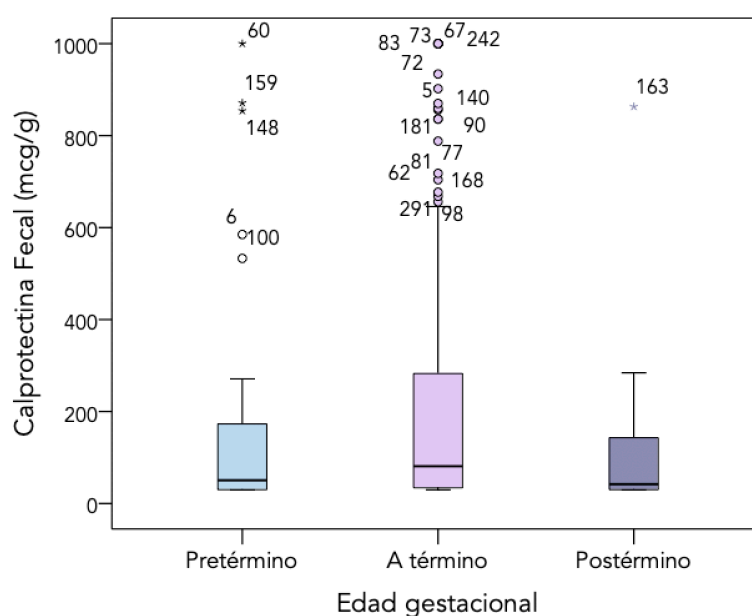


Figura 23: diagrama de cajas con la edad gestacional (niños nacidos pretérmino, a término y postérmino) y niveles de CF ($\mu\text{g/g}$) en 391 sujetos de 0 a 18 años (99% de la muestra).

Además, se analizó la edad gestacional como variable independiente cuantitativa. En los 391 sujetos en los que se recoge este dato, la media fue de 38.7 semanas de gestación (IC 95% de 38.4-39 semanas, DE 2.9), con una mediana de 39 semanas (RIC 2 semanas).

Se valoró la posible asociación de la edad gestacional (semanas) con la variable dependiente binaria CF normal (≤ 50 $\mu\text{g/g}$) o alterada (> 50 $\mu\text{g/g}$) mediante regresión logística. Se obtuvo una *odds ratio* (OR) de 1.029 con un IC al 95% de 0.960-1.103 con un nivel de significación por la prueba de Wald de 0.422 ($p > 0.05$), lo que sugiere una ausencia de relación entre ambas variables.

Para valorar la posible relación con la CF ($\mu\text{g/g}$) se calculó el coeficiente de correlación de Spearman, [(coeficiente de correlación = 0.02, $p = 0.75$ ($p > 0.05$)], lo que indica la ausencia de significación estadística. Esta significación tampoco se encontró en los grupos etarios al estudiarlos de forma independiente.

5.6.2 EL TIPO DE NACIMIENTO

No se objetivó relación entre el tipo de nacimiento y la CF.

Se analizó la posible relación entre el tipo de nacimiento y los niveles de CF (391 sujetos, el 99%). Se establecieron 2 categorías: nacimiento por vía vaginal (293 participantes, el 74.9%) o cesárea (98, el 25.1%). Se analizó en cada grupo si presentaban un nivel de CF alterado (> 50 $\mu\text{g/g}$) o normal (≤ 50 $\mu\text{g/g}$). Se estudió en ambas categorías el nivel de CF como variable dependiente cuantitativa ($\mu\text{g/g}$). Estos datos aparecen en la Tabla 13.

Resultados

Tipo de nacimiento número de sujetos (% del total)	CF >50 µg/g Recuento (% del grupo)	CF ≤50 µg/g Recuento (% del grupo)	CF media (IC 95%) DE µg/g	CF mediana (RIC) µg/g
Parto 293 (74.9%)	176 (60.1%)	117 (39.9%)	196.5 (168.8-224.1) 240.2	84 (249)
Cesárea 98 (25.1%)	62 (63.3%)	36 (36.7%)	183.5 (140.7-226.2) 213.2	77.5 (243)

Tabla 13: tipo de nacimiento y niveles de CF alterados (>50 µg/g) o normales (≤50 µg/g), así como media y mediana de CF en µg/g. IC: intervalo de confianza. DE: desviación estándar. RIC: rango intercuartílico.

En el análisis de la variable dependiente CF como cualitativa y binaria (CF alterada o no) para la variable independiente tipo de nacimiento (parto o cesárea) se aplicó la prueba de Chi-cuadrado de Pearson y no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos [$X^2 = 0.315$, gl = 1, $p = 0.575$ ($p > 0.05$)]. Al analizar cada grupo etario con las pruebas de Chi cuadrado o de Fisher según correspondiera, no se encontró asociación estadísticamente significativa.

Se estudió la posible relación del tipo de nacimiento con el nivel de CF como variable cuantitativa (µg/g) mediante prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, con una significación de 0.773 ($p > 0.05$), lo que sugiere la ausencia de diferencias significativas entre los dos tipos de nacimiento. El diagrama de cajas (Figura 24) muestra estos datos.

Se aplicó la misma prueba en los distintos grupos etarios, y se obtuvo en todos ellos una $p > 0.05$, por lo que se asume la ausencia de diferencias significativas entre los dos tipos de nacimiento en todas las edades.

Resultados

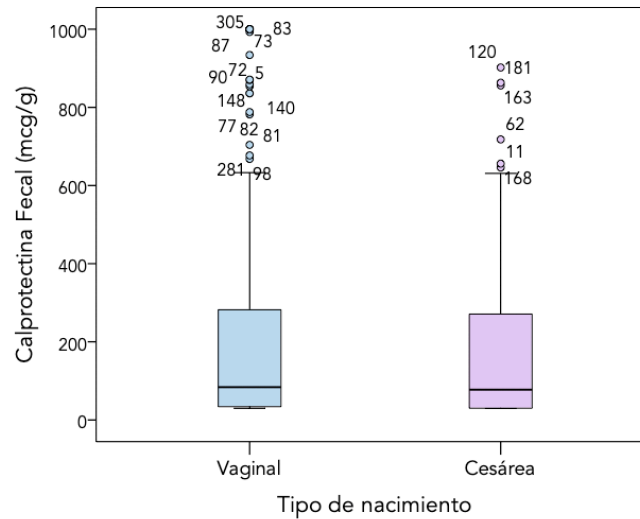


Figura 24: diagrama de caja con las variables tipo de nacimiento (293 por vía vaginal y 98 por cesárea) y CF ($\mu\text{g/g}$) en toda la muestra, de 0 a 18 años (391 sujetos en total).

5.6.3 EL PESO AL NACIMIENTO

No se objetivó relación entre el peso al nacimiento y la CF.

Se registró el peso al nacimiento en 392 sujetos del total de la muestra (99.2%). El mínimo peso al nacimiento fue de 750 gr y el máximo de 4.9 Kg con un rango de 4.2 Kg. La media fue de 3.2 Kg (IC 95% de 3.1- 3.2 Kg, DE 0.6), y la mediana fue de 3.2 Kg (RIC 0.6 Kg).

Para valorar la existencia de asociación entre el peso al nacimiento como variable predictora cuantitativa (Kg) y la variable dependiente binaria CF normal ($\leq 50 \mu\text{g/g}$) o alterada ($> 50 \mu\text{g/g}$) se aplicó la regresión logística. Se obtuvo una OR de 1.193 con un IC al 95% de 0.877- 1.624 con un nivel de significación por la prueba de Wald de 0.262 ($p > 0.05$), lo que indica la ausencia de relación entre ambas variables. Se llevó a cabo el mismo estudio en cada grupo de edad y no se encontró relación en ninguno de ellos.

Resultados

Se analizó la CF como variable dependiente cuantitativa ($\mu\text{g/g}$), con el hallazgo de un coeficiente de correlación de Spearman de 0.047, con una significación de 0.36 ($p > 0.05$), lo que indica la ausencia de asociación. Al estudiar este dato en cada grupo etario, no se encuentra relación en ninguno de ellos.

5.7 CORRELACIÓN ENTRE EL TIPO DE LACTANCIA Y EL NIVEL DE CF

No se objetivó relación entre el tipo de lactancia en los primeros 6 meses de vida y la CF.

Se analizó la posible correlación entre el tipo de alimentación y los niveles de CF en los lactantes menores de 6 meses. Esta información se recogió en 104 de los 107 sujetos del grupo (97.2%). Se establecieron 3 categorías en función de si los participantes recibían en el momento de la recogida de la muestra lactancia materna exclusiva (69 lactantes, el 66.4%), lactancia mixta (9, el 8.7%) o fórmula de inicio de forma exclusiva (26, el 25%). Se analizó en cada grupo si presentaban un nivel de CF alterado ($>50 \mu\text{g/g}$) o normal ($\leq 50 \mu\text{g/g}$), así como la media y mediana de CF ($\mu\text{g/g}$), como aparece en la Tabla 14.

Tipo de lactancia número de sujetos (% del total)	CF $>50 \mu\text{g/g}$ Recuento (% del grupo)	CF $\leq 50 \mu\text{g/g}$ Recuento (% del grupo)	CF media (IC 95%) DE $\mu\text{g/g}$	CF mediana (RIC) $\mu\text{g/g}$
LM exclusiva 69 (66.4%)	65 (94.2%)	4 (5.8%)	423.6 (354.9-492.4) 286.2	343 (392)
Fórmula exclusiva 26 (25%)	25 (96.2%)	1 (3.8%)	284.3 (223.9-344.8) 149.6	274 (210)
Lactancia mixta 9 (8,7%)	8 (88.9%)	1 (11.1%)	389.2 (178.4-600) 274.2	331 (261)

Tabla 14: tipo de alimentación en lactantes menores de 6 meses y niveles de CF alterados ($>50 \mu\text{g/g}$) o normales ($\leq 50 \mu\text{g/g}$) así como media y mediana de CF en $\mu\text{g/g}$. LM: lactancia materna. IC: intervalo de confianza. DE: desviación estándar. RIC: rango intercuartílico.

Resultados

Los resultados del test estadístico exacto de Fisher [(Valor 1.133, $p = 0.62$ ($p > 0.05$))] indicaron la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los valores de CF normales o alterados entre los distintos tipos de alimentación.

Para el estudio de la variable dependiente CF como cuantitativa ($\mu\text{g/g}$), se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis con una significación de 0.13 ($p > 0.05$), que indicó la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos. En la Figura 25 se muestran los resultados.

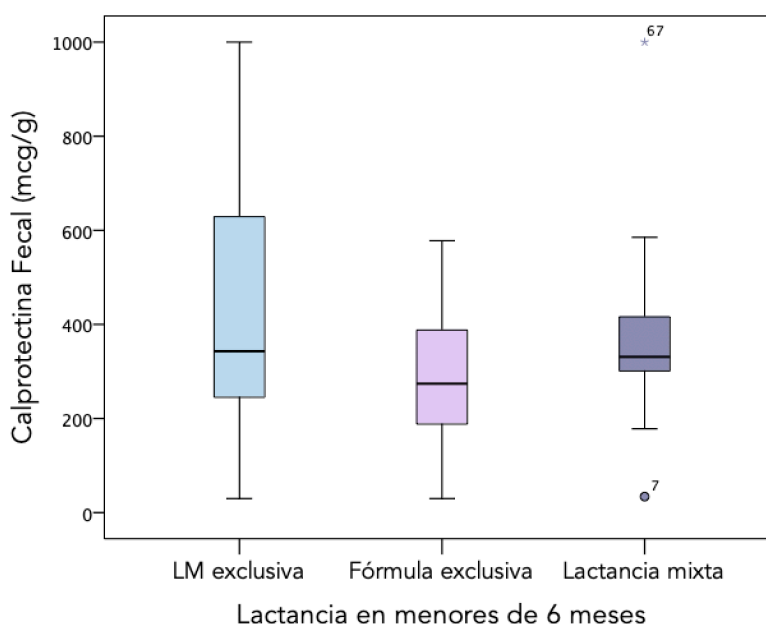


Figura 25: diagrama de caja con las variables tipo de lactancia (69 con LM exclusiva, 26 con fórmula exclusiva y 9 con lactancia mixta) y CF ($\mu\text{g/g}$) en los menores de 6 meses. LM: lactancia materna.

5.7.1 SUBGRUPOS ETARIOS ENTRE LOS LACTANTES MENORES DE 6 MESES

No se objetivó relación entre el tipo de lactancia en el grupo de neonatos ni en el grupo de 1 a 5 meses de vida y la CF.

Resultados

Dentro del grupo de lactantes menores de 6 meses, se estudió este dato en el subgrupo de recién nacidos (43 sujetos, 33 con LM exclusiva, 5 con fórmula exclusiva y 5 con lactancia mixta), con los resultados que se muestran en la Tabla 15. Para ello, se comprobó la normalidad de la distribución con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se aplicó el test de ANOVA de un factor con una significación de 0.66 ($p > 0.05$), lo que indica la ausencia de diferencias significativa entre estos grupos.

Tipo de lactancia número de sujetos (% del total)	CF media ($\mu\text{g/g}$) (IC 95%) DE	CF mediana ($\mu\text{g/g}$) (RIC)
LM exclusiva 33 (76.7%)	360.5 (279.2-441.8) 229.2	305 (211)
Fórmula exclusiva 5 (11.6%)	273.2 (149.9-396.5) 99.3	266 (173)
Lactancia mixta 5 (11.6%)	308.8 (44.8-572.9) 212.7	331 (395)

Tabla 15: tipo de alimentación en recién nacidos (de 0 a 1 mes, 43 recién nacidos) y media y mediana de CF en $\mu\text{g/g}$. LM: lactancia materna. IC: intervalo de confianza. DE: desviación estándar. RIC: rango intercuartílico.

Se analizó de la misma forma el subgrupo de lactantes de 1 a 5 meses, en el que se recogió este dato en 61 de los 64 sujetos (95.3%) (36 con LM exclusiva, 21 con fórmula exclusiva y 4 con lactancia mixta), con los resultados que se muestran en la Tabla 16.

Dada la ausencia de distribución normal demostrada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con una significación de 0.09 ($p > 0.05$), lo que indica la ausencia de diferencias significativa entre estos grupos.

Resultados

Tipo de lactancia número de sujetos (% del total)	CF media (µg/g) (IC 95%) DE	CF mediana (µg/g) (RIC)
LM exclusiva 36 (59%)	481.5 (372.5-590.6) 322.3	394 (513)
Fórmula exclusiva 21 (34.4%)	287 (213.6-360.3) 161.2	282 (221)
Lactancia mixta 4 (6.6%)	489.8 (52.2-1031.7) 340.6	329 (530)

Tabla 16: tipo de alimentación en los lactantes de 1 a 5 meses y media y mediana de CF en µg/g. LM: lactancia materna. IC: intervalo de confianza. DE: desviación estándar. RIC: rango intercuartílico.

5.8 CORRELACIÓN ENTRE LA ANTROPOMETRÍA Y EL NIVEL DE CF

5.8.1 EL PESO

No se observó una correlación entre el peso y el nivel de CF.

El peso se registró en 389 participantes (98.7% de la muestra). El peso mínimo fue de 2.2, el máximo de 73 Kg, con un rango de 70.8 Kg. El peso medio fue de 18 Kg (IC 95% de 16.4-19.6 Kg; DE 16 Kg), con una mediana de 11.8 Kg (RIC 18.1).

Se estudió la existencia de asociación entre la variable predictora cuantitativa peso (Kg) y la variable dependiente binaria CF normal ($\leq 50 \mu\text{g/g}$) o alterada ($> 50 \mu\text{g/g}$) mediante regresión logística. Se obtuvo una OR de 0.93 con un IC al 95% de 0.92-0.95 con un nivel de significación por la prueba de Wald de 0.00 ($p < 0.05$), que indica una relación negativa entre ambas variables. Sin embargo, al realizar el mismo análisis en cada grupo de edad por separado, no se encontró esta relación en ninguno de ellos.

Se estudió la posible correlación entre la variable independiente cuantitativa peso (Kg) y la variable dependiente cuantitativa calprotectina fecal ($\mu\text{g/g}$). El coeficiente de correlación de Spearman fue de -0.606, con una significación bilateral de 0.00 ($p < 0.05$), indicando una correlación negativa entre las variables ($-1 < r < 0$). En el análisis por edades, solo en el grupo de 1 a 5 meses se halló un coeficiente de correlación de Spearman de -0.340 con significación < 0.05 .

Se calculó la desviación estándar (DE) del peso de 388 sujetos (98.2% de la muestra). El mínimo fue de -3.3 y el máximo de 4.3 con un rango de 7.6. La media fue de -0.3 (IC 95% de -0.5 a -0.2; DE 1.1), con una mediana de -0.4 (RIC 1.3). Se valoró la

Resultados

existencia de una posible correlación entre esta y la variable dependiente cuantitativa CF ($\mu\text{g/g}$) con un coeficiente de correlación de Spearman de -0.067, y una significación bilateral de 0.190 ($p > 0.05$). Esto sugiere la ausencia de correlación entre las variables. En la Figura 26 se representa el gráfico de dispersión de la relación entre estas variables.

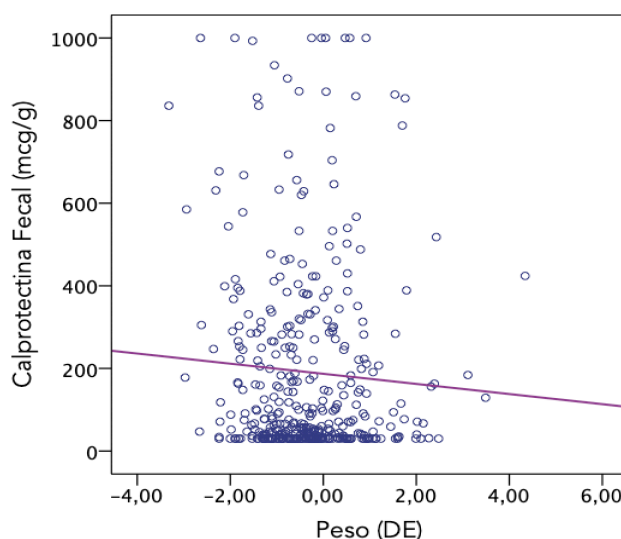


Figura 26: gráfico de dispersión de la variable dependiente CF ($\mu\text{g/g}$) respecto a la variable independiente peso en DE en 388 sujetos (98.2% del total de la muestra).

Para corregir la edad como posible factor de confusión se llevó a cabo el análisis multivariante *post hoc* con hallazgo de un coeficiente mayor del 10% respecto al del análisis univariante, por lo que ha de asumirse como correcta la significación hallada en el análisis multivariante que fue 0.58 ($p > 0.05$). Se puede concluir que no se encontró relación entre el peso y la CF.

5.8.2 LA TALLA

Se objetivó una correlación negativa entre la talla y el nivel de CF.

La talla se registró en 383 sujetos (97% del total de la muestra). El mínimo fue de 46 y el máximo de 185 cm, con un rango de 139 cm. La talla media fue de 94.2 cm (IC 95% de 90.4- 98 cm; DE 37.4 cm), con una mediana de 85 cm (RIC 61 cm).

Se estudió la asociación entre la variable independiente cuantitativa talla (cm) y la variable dependiente binaria CF normal ($\leq 50 \mu\text{g/g}$) o alterada ($> 50 \mu\text{g/g}$) mediante regresión logística. Se obtuvo una OR de 0.037 con un IC al 95% de 0.018-0.076 y un nivel de significación por la prueba de Wald de 0.00 ($p < 0.05$), que indica la existencia de una relación inversa entre las variables. Al realizar el mismo análisis en cada grupo de edad, solo se encontró esta relación en el grupo de 4 a 7 años con un nivel de significación por la prueba de Wald de 0.01 ($p < 0.05$).

Se valoró la existencia de una posible correlación entre la variable independiente cuantitativa talla (cm) y la variable dependiente cuantitativa calprotectina fecal ($\mu\text{g/g}$) mediante el coeficiente de correlación de Spearman, que arrojó un valor de -0.620, con una significación bilateral de 0.00 ($p < 0.05$). Esto indica la existencia de una correlación negativa entre ambas variables ($-1 < r < 0$). Al realizar el mismo análisis en cada grupo de edad, solo se encontró un coeficiente de correlación de Spearman negativo en los grupos de 1 a 5 meses, de 2 a 3 años y de 4 a 7 años, con una significación < 0.05 .

Se calculó la desviación estándar (DE) de la talla de cada sujeto. El mínimo fue de -5.4 y el máximo de 3.9, con un rango de 9.3. La media fue de -0.3 (IC 95% de -0.4 a -0.1; DE 1.3), con una mediana de -0.3 (rango intercuartílico 1.6). Se valoró la existencia de una posible correlación con la variable dependiente cuantitativa CF ($\mu\text{g/g}$) mediante el coeficiente de correlación de Spearman, que arrojó un valor de -0.1, con una significación bilateral de 0.02 ($p < 0.05$). Esto indica la existencia de una correlación negativa entre ambas variables ($-1 < r < 0$) (Figura 27).

Resultados

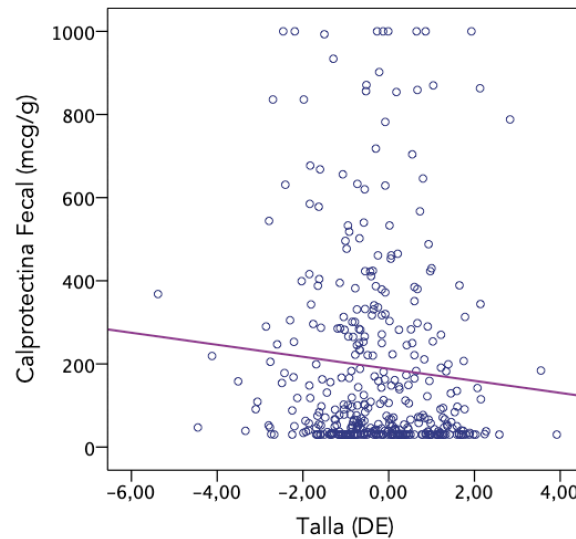


Figura 27: gráfico de dispersión de la variable dependiente CF ($\mu\text{g/g}$) respecto a la variable independiente DE de talla en 382 sujetos (96.7% del total de la muestra).

Para corregir la edad como posible factor de confusión, se realizó el análisis multivariante *post hoc* con hallazgo de un coeficiente mayor del 10% respecto al del análisis univariante, por lo que ha de asumirse como correcta la significación hallada en el análisis multivariante que fue 0.02 ($p < 0.05$), y se puede asumir que se encontró una relación entre la talla y la CF.

5.8.3 EL IMC

No se observó una correlación entre el IMC y el nivel de CF.

El índice de masa corporal (IMC) pudo calcularse en 382 sujetos (96.7% de la muestra). El IMC mínimo fue de 10.2 Kg/m^2 , el máximo de 25.4 Kg/m^2 , con un rango de 15.2. El IMC medio fue de 16.4 Kg/m^2 (IC 95% de $16.2\text{-}16.7 \text{ Kg/m}^2$; DE 2.6 Kg/m^2), con una mediana de 16.3 Kg/m^2 (rango intercuartílico 3.1 Kg/m^2).

Resultados

Se valoró la posible asociación del IMC (Kg/m^2) con la variable dependiente binaria CF normal ($\leq 50 \mu\text{g/g}$) o alterada ($> 50 \mu\text{g/g}$) mediante regresión logística. Se obtuvo una OR de 0.822 con un IC al 95% de 0.756-0.894, con un nivel de significación por la prueba de Wald de 0.00 ($p < 0.05$), que indica una relación negativa entre ambas variables. Sin embargo, no se encontró esta relación en ninguno de los grupos etarios por separado.

Se estudió la posible correlación entre la variable independiente cuantitativa IMC (Kg/m^2) y la variable dependiente cuantitativa CF ($\mu\text{g/g}$). El coeficiente de correlación de Spearman fue de -0.295, con una significación bilateral de 0.00 ($p < 0.05$), indicando una correlación negativa entre las variables ($-1 < r < 0$). Se llevó a cabo este análisis por edades, y solo se encontró una significación $p < 0.05$ en el grupo de recién nacidos (de 0 a 1 mes), en el que el coeficiente de correlación de Spearman fue de 0.393, lo que indica una relación directa entre las variables IMC (Kg/m^2) y CF ($\mu\text{g/g}$).

Se calculó la desviación estándar (DE) del IMC de 380 participantes. La media fue de -0.248 (IC 95% de -0.353 a -0.1434), con una mediana de -0.365. El mínimo fue de -3.19 y el máximo de 6.56 con un rango de 9.75. Se valoró la existencia de su posible correlación con la variable dependiente cuantitativa CF ($\mu\text{g/g}$) mediante el coeficiente de correlación de Spearman, que arrojó un valor de -0.029, con una significación bilateral de 0.57 ($p > 0.05$). Esto sugiere la ausencia de correlación entre ambas variables (Figura 28).

Resultados

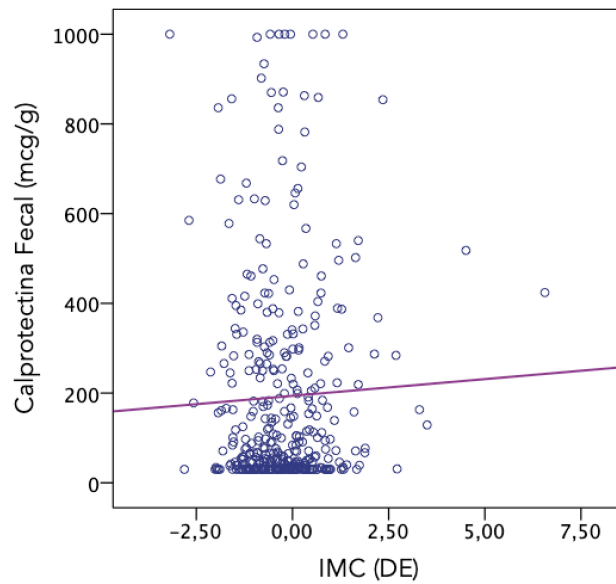


Figura 28: gráfico de dispersión de la variable dependiente CF ($\mu\text{g/g}$) respecto a la variable independiente DE de IMC en 380 sujetos (96.2% del total de la muestra).

Para corregir la edad como posible factor de confusión se llevó a cabo el análisis multivariante *post hoc* con hallazgo de un coeficiente mayor del 10% respecto al del análisis univariante, por lo que ha de asumirse como correcta la significación hallada en el análisis multivariante que fue 0.33 ($p > 0.05$), y se puede concluir que no se encontró relación entre el IMC y la CF.

5.9 CORRELACIÓN ENTRE LA MEDICACIÓN RECIBIDA Y EL NIVEL DE CF

Se objetiva una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de CF en los sujetos que habían tomado vitamina D frente a aquellos que no.

Sin embargo, esta diferencia no se objetiva al analizar por separado los distintos grupos etarios.

Tal y como se especifica en el apartado “material y métodos”, la toma de ciertos medicamentos en los 15 días previos a la recogida de la muestra supuso un motivo de exclusión relativo.

Sin embargo, se incluyeron los sujetos que habían recibido otros tratamientos en dicho periodo, y se analizó la posible relación de estos con los niveles de CF alterados ($>50 \mu\text{g/g}$) o normales ($\leq 50 \mu\text{g/g}$), así como con la concentración de CF en $\mu\text{g/g}$, en los 395 participantes (100%) de 0 a 18 años. Para ello, se dividió a los sujetos en 3 categorías: sujetos que no habían recibido ninguna medicación (348 participantes), los que habían recibido vitamina D (32) y aquellos que habían recibido otra medicación (15), tal y como consta en la Tabla 17.

Tipo de mediación recibida en los 15 días previos a la recogida de la muestra número de sujetos (%)	CF $>50 \mu\text{g/g}$ Recuento (% del grupo)	CF $\leq 50 \mu\text{g/g}$ Recuento (% del grupo)	CF media (IC 95%) DE $\mu\text{g/g}$	CF mediana (RIC) $\mu\text{g/g}$
Ninguna medicación 348 (88.1%)	205 (58.9%)	143 (41.1%)	184.7 (160.5-208.8) 228.9	75 (223)
Vitamina D 32 (8.1%)	26 (81.2%)	6 (18.8%)	312 (210.6-413.5) 281.4	283 (393)
Otros 15 (3.8%)	8 (53.3%)	7 (46.7%)	96.3 (48.6-56) 86.1	56 (104)

Resultados

Tabla 17: medicación recibida antes de la recogida de la muestra, nivel de CF alterado ($>50 \mu\text{g/g}$) o normal ($\leq 50 \mu\text{g/g}$) y CF media y mediana, en los 395 sujetos (100%) de 0 a 18 años. IC: intervalo de confianza. DE: desviación estándar. RIC: rango intercuartílico.

Al aplicar la prueba de Chi-cuadrado de Pearson se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa para el nivel de CF alterado o no entre estas categorías [$X^2=6.457$, $gl=12$, $p=0.04$ ($p<0.05$)]. Se observó un mayor porcentaje de sujetos con CF alterada en aquellos que tomaron Vitamina D.

Así mismo, al analizar la CF como variable dependiente cuantitativa ($\mu\text{g/g}$), se compararon las medias de cada subgrupo con la prueba de Kruskal-Wallis, al tratarse de distribuciones no normales. Se obtuvo una significación de 0.01 ($p<0.05$), que indica la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre grupos. En la Figura 29 se muestra la representación gráfica de estos datos.

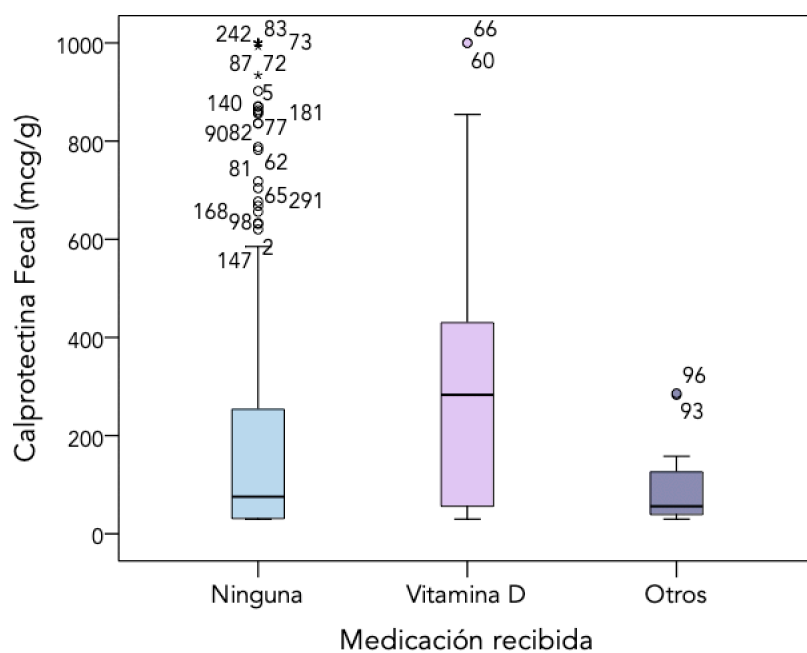


Figura 29: diagrama de cajas con el tipo de medicación recibida en los 15 días previos a la recogida de la muestra y niveles de CF ($\mu\text{g/g}$), en los 395 sujetos (100%) de 0 a 18 años.

Resultados

En el análisis post hoc, se llevaron a cabo las comparaciones múltiples entre todas las posibles combinaciones mediante la prueba de Scheffé. Los sujetos que recibieron vitamina D presentaron un nivel de CF mayor, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) frente a los que tomaron otros fármacos o ninguno.

Se estudió esta posible diferencia en cada grupo etario previamente establecido, y se obtuvieron los datos que aparecen en la Tabla 18.

Grupo etario (número de sujetos)	Tipo de medicación recibida en los 15 días previos a la recogida de la muestra (número de sujetos)	CF >50 µg/g Recuento (% del grupo)	CF ≤50 µg/g Recuento (% del grupo)	CF media (IC 95%) DE µg/g	CF mediana (RIC) µg/g
<1 mes (43)	Ninguna (33)	29 (87.9%)	4 (12.1%)	355.7 (273-438.3) 233.1	313 (229)
	Vitamina D (10)	10 (100%)	0 (0%)	306.9 (204.4-409.4) 143.3	284 (176)
1-5 meses (64)	Ninguna (50)	49 (98.0%)	1 (2%)	418 (333.8-502.3) 296.4	315 (452)
	Vitamina D (12)	11 (91.7%)	1 (8.3%)	472 (278.4-665.7) 304.8	427 (314)
	Otros (2*) *Domperidona (1) *Enterosilicona (1)	2 (100%)	0 (0%)	284.5 (265.4-303.6) 2.1	284.5 (-)
6-11 meses (46)	Ninguna (36)	25 (69.4%)	11 (30.6%)	180.2 (104-256.4) 225.2	74.5 (195)
	Vitamina D (7)	4 (57.1%)	3 (42.9%)	160.1 (-123-443.3) 306.2	52 (28)
	Otros (3*) *MgCO ₃ (Eupeptina®) (2) *Paracetamol (1)	0 (0%)	3 (100%)	35.3 (23.6-47.1) 4.7	37 (-)
12-23 meses (42)	Ninguna (39)	30 (76.9%)	9 (23.1%)	230.2 (150.6-309.8) 245.6	115 (311)
	Vitamina D (2)	1 (50%)	1 (50%)	50.5 (-210-311) 29	50.5 (-)
	Otros (1*) *PEG 3350 +electrolitos (Movicol®) (1)	1 (100%)	0 (0%)	-	-

Resultados

2-3 años (45)	Ninguna (41)	23 (56.1%)	18 (43.9%)	118.4 (83.4-153.4) 110.7	71 (149)
	Otros (4*) *Levetiracetam (1) *PEG 4000 (Casenlax®) (1) *MgCO ₃ (Eupeptina®) (1) *Antihistamínico (1)	3 (75%)	1 (25%)	92.3 (9.8-174.7) 51.8	82.5 (97)
4-7 años (64)	Ninguna (64)	28 (43.8%)	36 (56.2%)	89.1 (63.2-114.9) 103.5	46 (89)
8-11 años (46)	Ninguna (41)	11 (26.8%)	30 (73.2%)	87.7 (35.5-139.8) 165.3	33 (59)
	Otros (5*) *Antihistamínico (1) *Salbutamol y Budesonida inhalados (1) *Antitusígeno, no especificado (1) *Metilfenidato (Medikinet®) y Enalapril (1) *Olea europea (1)	2 (40%)	3 (60%)	66.8 (10.4-123.2) 45.4	50 (73)
12-18 años (45)	Ninguna (44)	10 (22.7%)	34 (77.3%)	45.6 (35.4-55.7) 33.5	30 (20)
	Vitamina D (1)	0 (0%)	1 (100%)	-	-

Tabla 18: medicación recibida en los 15 días previos a la recogida de la muestra por grupos etarios, nivel de CF alterado (>50 µg/g) o normal (≤50 µg/g) y CF media y mediana, en los 395 sujetos (100%) de 0 a 18 años. PEG: Polietilenglicol; MgCO₃: carbonato de magnesio. IC: intervalo de confianza. DE: desviación estándar. RIC: rango intercuartílico.

El análisis previo no pudo realizarse en el grupo de 4 a 7 años, en el que ningún sujeto había recibido medicación. En el resto de las edades, se estudió la posible relación de la medicación recibida con tener CF alterada (>50 µg/g) o normal (≤50 µg/g), para lo que se aplicó en cada grupo el test exacto de Fisher sin objetivarse diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Para estudiar la CF como variable dependiente cuantitativa (µg/g), en función de la medicación recibida en cada grupo etario se aplicó según correspondiera la prueba de ANOVA (en el grupo de 0 a 1 mes) o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (en el resto de los grupos). En ninguno se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa para dicho dato (en todos ellos, $p > 0.05$).

5.10 CORRELACIÓN ENTRE LA ASISTENCIA A CENTRO ESCOLAR Y EL NIVEL DE CF

Se encontraron niveles de CF inferiores en los sujetos que asistían a centro escolar frente a los que no.

Sin embargo, al analizar por grupos etarios solo se mantuvo una diferencia estadísticamente significativa en el grupo de 12 a 23 meses, con valores de CF mayores en los que acuden a guardería.

Se analizó si la asistencia a colegio o instituto, o bien a guardería podía influir en los niveles de CF alterados ($>50 \mu\text{g/g}$) o normales ($\leq 50 \mu\text{g/g}$), dividiendo a los participantes en tres categorías: asistencia a guardería, a colegio o instituto, o a ninguno de ellos. Se obtuvo dicha información en los 395 sujetos (100%). Los resultados se resumen en la Tabla 19.

Asistencia a centro escolar o guardería (número de participantes)	CF $>50 \mu\text{g/g}$ Recuento (% del grupo)	CF $\leq 50 \mu\text{g/g}$ Recuento (% del grupo)	CF media (IC 95%) DE $\mu\text{g/g}$	CF mediana (RIC) $\mu\text{g/g}$
No asisten a ningún centro 186 (47.1%)	152 (81.7%)	34 (18.3%)	285 (246.6-323.4) 265.5	220.5 (330)
Asisten a guardería 52 (13.2%)	35 (67.3%)	17 (32.7%)	216.5 (151.1-282) 235.1	118 (258)
Asisten a colegio o instituto 157 (39.8%)	52 (33.1%)	105 (66.9%)	72.7 (56.6-88.8) 102.2	37 (45)

Tabla 19: estudio de la posible relación entre la asistencia a guardería, colegio o instituto y los niveles de CF alterados ($>50 \mu\text{g/g}$) o normales ($\leq 50 \mu\text{g/g}$). IC: intervalo de confianza. DE: desviación estándar. RIC: rango intercuartílico.

Resultados

Tras realizar la prueba de Chi-cuadrado de Pearson se objetivó una diferencia estadísticamente significativa para el nivel de CF alterado ($>50 \mu\text{g/g}$) o normal ($\leq 50 \mu\text{g/g}$) entre estas categorías [$X^2=85.309$, $gl=2$, $p=0.00$ ($p<0.05$)]. Se observa un mayor porcentaje de sujetos con CF alterada en los que no acuden a ningún centro.

Para estudiar las diferencias en la concentración media de CF ($\mu\text{g/g}$) en cada categoría se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con la que también se observó una diferencia estadísticamente significativa [$p=0.00$ ($p<0.05$)]. La representación gráfica aparece en la Figura 30.

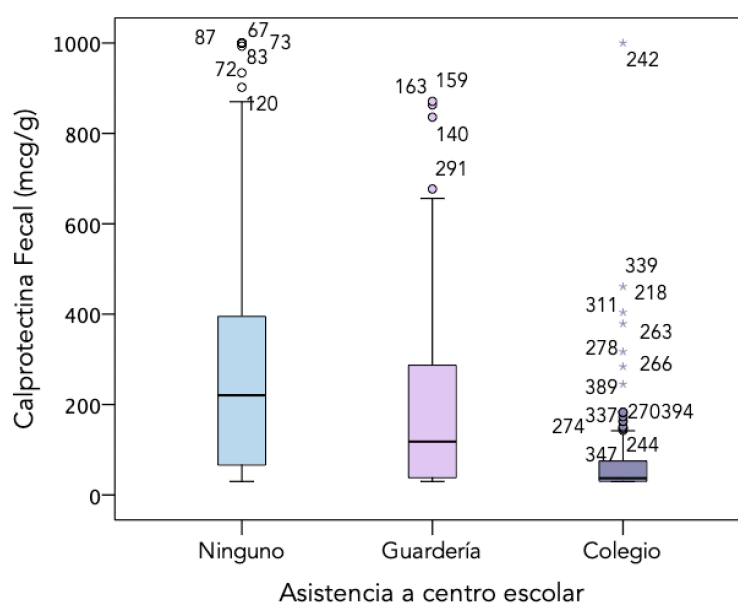


Figura 30: diagrama de cajas con la asistencia a guardería, colegio o instituto, o a ninguno de ellos y niveles de CF ($\mu\text{g/g}$), en los 395 sujetos (100%) de 0 a 18 años.

Se estudió la posible diferencia en los valores normales o alterados de CF según la asistencia o no a estos centros en cada grupo etario. El análisis no pudo realizarse en el grupo de menores de 1 mes, en el que ninguno acudía a guardería, ni en los grupos de 8 a 11 y de 12 a 18 años, en los que todos acudían a colegio o instituto. En el resto de las edades, se aplicó el test exacto de Fisher sin demostrarse diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$).

Resultados

Se estudió también la CF como variable dependiente cuantitativa ($\mu\text{g/g}$), en función de la asistencia a guardería, colegio o instituto, o ninguno de ellos en los grupos etarios mencionados, para lo que se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En el grupo de 12 a 23 meses se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa [$p = 0.02$ ($p < 0.05$)], con aumento de CF en aquellos que asisten a guardería ($n = 14$, CF mediana 298 $\mu\text{g/g}$) frente a los que no ($n = 28$, CF mediana 124 $\mu\text{g/g}$), tal y como aparece representado en la Figura 31. En los demás grupos no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa para dicho dato (en todos ellos, $p > 0.05$).

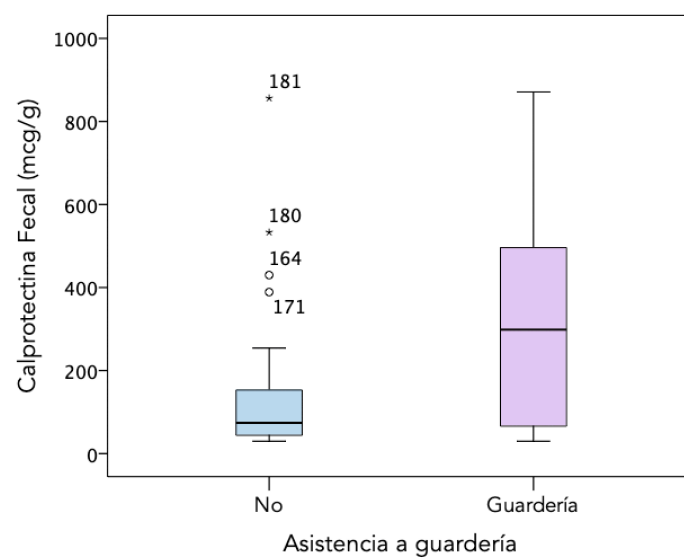


Figura 31: diagrama de cajas con los niveles de CF en función de la asistencia a guardería en el grupo de 12 a 23 meses de edad ($n = 42$).

6 DISCUSIÓN

6.1 REPRESENTATIVIDAD DE LA MUESTRA

El objetivo principal de este trabajo fue la determinación de los valores de normalidad de CF en la población pediátrica sana de nuestro entorno, por lo que se reclutó a los niños que acudieron a su Centro de Salud por una revisión rutinaria, para la administración de vacunas, en ausencia de síntomas digestivos y sin toma previa de la medicación descrita en los criterios de exclusión. Estos criterios buscaban facilitar la inclusión de participantes con estado de salud, a diferencia de otros estudios como los de Baldassarre *et al.*, Fagerberg *et al.*, o Davidson *et al.*, en los que se pretendía estudiar población sana pero se incluyeron respectivamente familiares de personal sanitario, pacientes ingresados, o sujetos a los que se les solicitó por decisión médica una determinación de CF^{59, 143,154}. Estas características pudieron limitar la asunción del estado de salud de los participantes.

En el presente trabajo, a pesar de los criterios aplicados, no puede garantizarse el estado de salud de todos los participantes, al no haberse realizado otras pruebas complementarias como análisis de sangre o endoscopia por las implicaciones éticas correspondientes. Por otro lado, se analizó una segunda muestra en 6 de los 8 sujetos con CF igual o mayor de 1000 µg/g, que fue en todos los casos inferior a la primera determinación. Además, se pudo realizar un control telefónico tras un mínimo de 2 años tras el estudio en 6 de ellos, y todos refirieron seguir entonces asintomáticos y con adecuado desarrollo ponderoestatural.

Tal y como se desarrolla en los siguientes apartados, los sujetos incluidos pueden equipararse a la población de nuestro entorno en cuanto a las variables sexo, factores perinatales, tipo de lactancia, y antropometría. Así, podría considerarse una adecuada representatividad de la muestra para estas características, aunque la

potencial existencia de otras variables relacionadas con la CF no consideradas en este estudio pudiera limitar la misma¹⁹⁸.

Se estableció un tamaño muestral objetivo de 383 sujetos, y se incluyeron finalmente 395, con una edad media de 4.17 años (mínimo 3 días y máximo 16 años y 11 meses). Esta muestra es superior a las de la mayoría de estudios previos, procede del medio urbano de Madrid y abarca toda la edad pediátrica, a diferencia de trabajos que se centraban en un subgrupo etario^{59, 144, 153,155,156}.

Los sujetos fueron distribuidos por grupos en función de las edades establecidas para los controles de salud rutinarios y para la administración de vacunas. Además, se consideró que el grupo de recién nacidos y lactantes, por tener unas características muy diferentes al resto de edades pediátricas (alimentación, flora intestinal, madurez inmunológica, y otros factores), precisaban subgrupos independientes para su estudio específico. Finalmente se establecieron 8 grupos etarios con un mínimo de 42 participantes (Tabla 3).

6.2 NIVELES DE CF EN EL CONJUNTO DE LA MUESTRA

Los valores de CF en niños sanos fueron superiores a los niveles considerados como alterados en adultos.

El test de Kolmogorov-Smirnov mostró que los valores de concentración de CF no seguían una distribución normal, por lo que se consideró que los parámetros de tendencia central y dispersión que mejor representaban la muestra eran la mediana, el rango o amplitud intercuartil y los percentiles.

Tal y como se especifica en el apartado de metodología, la prueba disponible en nuestro centro para la determinación de CF en el momento de la realización del estudio solo permitía analizar cuantitativamente los valores comprendidos entre 30 y 1000 $\mu\text{g/g}$. El resto de los resultados extremos son etiquetados por el test como CF <30 o CF >1000 $\mu\text{g/g}$. Para poder computar estos valores extremos en el programa estadístico empleado, se sustituyeron los valores " $\leq 30 \mu\text{g/g}$ " y " $\geq 1000 \mu\text{g/g}$ " por " $30 \mu\text{g/g}$ " y " $1000 \mu\text{g/g}$ " respectivamente. Se objetivó en el estudio estadístico que la distribución de estos valores no era homogénea por grupos de edades, tal y como se muestra en la Tabla 5. Se obtuvo un claro predominio de sujetos con valores extremos inferiores (CF $\leq 30 \mu\text{g/g}$) en los grupos de mayor edad y una mayor frecuencia de valores extremos superiores (CF $\geq 1.000 \mu\text{g/g}$) en los grupos de menor edad.

Este hecho no afecta a la mediana ni a los percentiles ya que se calculan con el número de orden de los valores y por tanto no se alteran por los datos extremos. Sin embargo, sí pueden alterar la estimación de la media de CF en cada grupo de edad, por lo que se calculó dicho dato con y sin estos valores extremos.

Para el resto del análisis, que buscaba estudiar la posible relación de los niveles de CF con otras variables, la eliminación de estos valores extremos supondría una

posible pérdida de la representatividad de la muestra. No solo se disminuiría su tamaño, sino que se alteraría cualitativamente al no suprimirse casos al azar sino precisamente los valores más altos y más bajos, distribuidos de forma heterogénea entre grupos. Por ello, se decidió realizar el resto del estudio estadístico con el conjunto de todos los datos.

Tras el análisis de todos los sujetos se objetivó una mediana de CF de 77 $\mu\text{g/g}$, con un RIC de 246. y un rango de 970 (definido por los valores límite detectables por la prueba). Tras eliminar los valores extremos se obtuvo una mediana de 143.5 $\mu\text{g/g}$, con un RIC de 249 y un rango de 962.

Estos valores de tendencia central y dispersión basados en ordenaciones pretenden reflejar la cifra de CF normal en niños sanos. La mediana es en ambos casos superior a los 50 $\mu\text{g/g}$ aceptados como umbral alto de la normalidad en adultos y considerados hoy en día como referencia en la edad pediátrica^{7, 16, 19, 59, 61}. Este hecho es especialmente llamativo al realizar el análisis excluyendo los datos extremos.

Las publicaciones previas que evalúan los niveles de CF en niños sanos se limitan en general a muestras de pequeño tamaño, grupos etarios muy acotados o provienen de poblaciones heterogéneas. En la Tabla 1 aparecen los estudios más relevantes que reportan niveles de CF en población pediátrica sana. Dada la disparidad en el diseño e incluso en la forma de presentar los datos de estos estudios, es difícil realizar un análisis conjunto de los resultados.

En la revisión de la literatura realizada antes del inicio del presente trabajo no se encontraron publicaciones que abarcasen toda la edad pediátrica (de 0 a 18 años). Se identificaron algunos estudios con rangos etarios relativamente amplios, aunque la mayoría de ellos tienen como limitación el tamaño muestral reducido. Así, cabría mencionar el trabajo de Olafsdottir *et al.* con 24 sujetos de 1 a 13 años con una CF media de 40 $\mu\text{g/g}$ ¹⁴⁵ o el de Nissen *et al.* con 21 niños de 1 a 15 años y una mediana de 17 $\mu\text{g/g}$ ¹⁴⁰. Bunn *et al.* incluyeron 31 sujetos de 1.5 a 15.3 años con una CF mediana

de 11 $\mu\text{g/g}$ ⁵⁸ y Berni Canani *et al.* hasta 76 sujetos de entre 13 meses y 18 años, con un CF mediana de 28 $\mu\text{g/g}$ ⁴⁴.

Las publicaciones con mayor número de niños sanos y con un rango de edad más amplio eran la de Fagerberg *et al.*, con 117 sujetos de entre 4 y 17 años y una mediana de CF de 14 $\mu\text{g/g}$ ⁵⁹ y la de Hestvik *et al.*, con 54 participantes menores de 1 año y 159 de 4 a 12 años y unas medianas de CF de 249 $\mu\text{g/g}$ y 28 $\mu\text{g/g}$ respectivamente¹⁵⁰. Del primer estudio cabe señalar que se incluyeron niños sanos que acudían a guardería o al servicio sanitario escolar en Vasteras (ciudad situada a 100 km al oeste de Estocolmo, Suecia), pero también familiares de los trabajadores del hospital. Este hecho pudo alterar los resultados, ya que se ha descrito el mayor riesgo de adquirir y propagar infecciones especialmente respiratorias y de contacto por la naturaleza de su trabajo. Además, las muestras fueron enviadas por correo postal al laboratorio central, y no se especifica el tiempo total transcurrido entre su recogida y el procesamiento¹⁹⁹. El segundo estudio se llevó a cabo en el entorno urbano de Kampala (Uganda), por lo que se trataba de niños con factores ambientales, dietéticos y socio-económicos muy distintos a los que viven en nuestro medio¹⁵⁰.

Durante la realización del presente estudio, Davidson *et al.* publicaron en mayo de 2016 un trabajo con 87 niños de 1 a 4 años y 636 de 4 a 17.9 años, con unas medianas de CF de 75 $\mu\text{g/g}$ y 40 $\mu\text{g/g}$ respectivamente¹⁵⁴. Sin embargo, era un estudio retrospectivo que incluía participantes a los que se había solicitado una determinación de CF por criterio clínico. No se especificaron en este texto los síntomas o sospecha diagnóstica ni la posible toma de medicamentos por parte de estos sujetos, y tampoco se registró el tiempo que tardó en ser analizada la muestra desde su recogida, lo que limita el uso de los resultados como valores de referencia para población pediátrica sana.

Roca *et al.* estudiaron un total de 174 niños asintomáticos de 1 a 12 años divididos en 3 grupos etarios: 67 sujetos de ≤ 12 meses, 60 de 1 a 4 años y 47 mayores de 4 años y menores de 12¹⁵¹. Para ello, se reclutaron a niños que acudieron a su Centro

de Salud para realizar un control rutinario y también a los familiares de los trabajadores del Hospital, lo que como se ha mencionado pudo alterar los resultados. Sin embargo, se trataba de un estudio prospectivo en el que sí se detallaba la lista de criterios de exclusión aplicados, bastante similares a los del presente trabajo: diagnóstico previo de patología o infección gastrointestinal, presencia de síntomas compatibles, toma de fármacos en las 2 semanas previas al reclutamiento etc. Ofrecieron sus resultados en forma de valor superior de normalidad de CF (percentil 95 para cada grupo de edad), así como en nomograma de los valores de mediana y p95 para cada edad. No consta en la publicación el valor de la mediana de la CF de toda la muestra, por lo que no se puede comparar directamente con los datos de tendencia central global de nuestro estudio.

En los resultados de los investigadores que dividieron los sujetos estudiados por franjas etarias puede observarse una tendencia a la relación inversa entre edad y CF, como se comenta en el siguiente apartado.

6.3 NIVELES DE CF POR GRUPOS ETARIOS

La distribución de los participantes por grupos etarios fue previa al análisis estadístico. Se basó en las edades establecidas para los controles de salud rutinarios y para la administración de vacunas, considerando que la mayoría de los sujetos sanos serían más fácilmente captados cuando acudiesen al Centro de Salud en alguna de estas dos ocasiones. Se valoró además la necesidad de estudiar específicamente a los recién nacidos y lactantes dadas sus características diferenciales respecto al resto de edades pediátricas.

Por ello, los grupos finales no tienen la misma amplitud de rango etario, considerablemente menor en el grupo de neonatos que se restringe a los menores de un mes que en los grupos de sujetos mayores que agrupan niños con hasta 4 años de rango de edad. Sin embargo, se consideró que esta división se ajustaba más a las diferencias entre las distintas etapas del desarrollo y que los resultados obtenidos serían más fácilmente comparables con algunos de los estudios previos que establecían límites de edad similares. Finalmente, se utilizó la distribución por grupos de edades que aparece en la Tabla 3.

Los valores de tendencia central y dispersión del nivel de CF ($\mu\text{g/g}$) en cada grupo de edad aparecen representados en la Tabla 7 y en la Tabla 9.

6.3.1 NEONATOS

En el grupo de recién nacidos (todos aquellos menores de un mes de edad), se incluyeron 43 participantes, con una mediana de CF de 303 $\mu\text{g/g}$ y un RIC de 202. El 88% de estos neonatos fueron recién nacidos a término, por lo que nuestros datos son probablemente más equiparables a los de los estudios que analizaron este tipo de recién nacidos. Sin embargo, muchos de ellos estudiaron un escaso número de sujetos

o incluyeron rangos etarios no exactamente comparables al nuestro. Algunos reportan cifras de mediana de CF inferiores a la de nuestra muestra, como el de Rugveit *et al.* (n =20, edad 6 semanas, no se especifica edad gestacional), con una mediana de CF de 269 µg/g (RIC 193-808)¹⁴⁶; el de Nissen *et al.* (n =16, edad 3-18 días, edad gestacional entre 37 y 42 semanas), con una mediana de CF de 235 µg/g (RIC 172-2880), o el de Campeotto *et al.* (n =69, edad 3-7 días, edad gestacional entre 37 y 41.5 semanas), con una mediana de CF de 167 µg/g (rango 22-860).

Otros autores encontraron valores superiores. Savino *et al.* (n =39, edad 13-90 días) con una mediana de 555 µg/g (rango 123-2000) en aquellos con lactancia materna exclusiva, que fue el tipo de alimentación predominante en nuestra muestra (76.7% de los menores de un mes). Los trabajos de Olafsdottir *et al.*, Laforgia *et al.* y Asgarshirazi *et al.* expresaron sus resultados en valores medios de CF, por lo que no pueden compararse directamente con los del presente estudio^{138, 142,145}.

Los factores que influyen en la elevación de la CF en neonatos no están claros. Se ha sugerido que se deba a la mayor permeabilidad intestinal y el aumento de la migración de leucocitos a través de la mucosa intestinal, en el contexto del desarrollo del tejido linfoide asociado al intestino o GALT (Gut-associated Lymphoid Tissue). También se han involucrado causas ambientales como el tipo de lactancia y la colonización intestinal. Se ha observado que la presencia de factores que retrasan la colonización bacteriana, como la toma de antibióticos, se correlacionan negativamente con los niveles de CF^{144, 162,200-202}.

Estos cambios, que pueden ocurrir a lo largo de toda la edad pediátrica, probablemente sean más llamativos en los primeros 30 días de vida. Además, se han identificado valores elevados de CF en el primer meconio, que incluso aumentan en las siguientes deposiciones de estas características^{138,139}. El meconio contiene un conjunto de sustancias derivadas del líquido amniótico deglutido, productos de la degradación celular, secreciones intestinales y sangre materna, por lo que la elevación de la CF podría reflejar la influencia del conjunto de estos factores.

Baldassarre *et al.* analizaron la posible variación interindividual de la CF a lo largo del primer mes. Estudiaron a 71 neonatos nacidos a término (edad gestacional entre 37 y 41 semanas), recogiendo cuatro muestras de heces de cada neonato, en los días 3, 7, 12 y 30 de vida. Se observó un aumento significativo ($p < 0.001$) de los niveles de mediana CF entre el día 3 y el 7 (195 y 245 $\mu\text{g/g}$ respectivamente), y un aumento posterior más moderado, no significativo, hasta el día 30 (255 $\mu\text{g/g}$), datos inferiores a los hallados en la muestra de este trabajo. Cabe destacar que, aunque se calificó a estos neonatos de sanos, en el momento de la realización del estudio estaban ingresados en una unidad de cuidados intensivos neonatal, si bien los autores no especifican el motivo de ingreso. Además, el 43.7% de ellos había nacido mediante cesárea, lo que supone un porcentaje mayor al de la muestra del presente estudio (14% en los menores de 1 mes). Establecieron solo dos categorías de alimentación, lactancia materna (70.4%) y fórmula artificial (29.6%) pero no se especifica si alguno de ellos recibía lactancia mixta. Los autores no encontraron diferencias en función del tipo de nacimiento o de alimentación, pero los datos concretos de estos grupos no aparecen en la publicación por lo que no puede observarse la posible tendencia de niveles más bajos de CF en los nacidos por cesárea o los datos más concretos relativos a la alimentación¹⁴³.

6.3.2 LACTANTES DE 1 A 11 MESES

Se incluyeron 64 lactantes de 1 a 5 meses. Se obtuvo una mediana de CF de 325.5 $\mu\text{g/g}$ (RIC 375). Este resultado es difícilmente comparable a los publicados en otros trabajos, por las diferencias en cuanto al diseño o población de origen comentadas previamente. Dorosko *et al.* y Lee *et al.* analizaron en conjunto a los individuos de menos de 6 meses que incluye la franja de neonatos, lo que impide su comparación directa^{147,148}. Oord *et al.* analizaron este mismo rango etario (1-6 meses), con una mediana de CF de 192 $\mu\text{g/g}$, pero se limita a 9 participantes, lo que dificulta la extrapolación de resultados⁶¹.

En las publicaciones que se ciñen a la edad de 6 meses, los resultados son dispares. Rugtveit *et al.* analizaron 22 lactantes con una CF mediana de 79 µg/g (RIC 35-215)¹⁴⁶. Liu *et al.* encontraron diferencias significativas en los lactantes chinos de 6 meses de medio rural (n =105, CF mediana 421 µg/g) y medio urbano (n =39, CF mediana 140 µg/g)¹⁴⁹.

En este estudio se analizó un grupo de 46 lactantes entre 6 y 11 meses de edad. La CF mediana fue de 63 µg/g y el RIC de 126 µg/g. Estos resultados pueden compararse con el estudio de Oord *et al.* del mismo rango etario. Encontraron una mediana de 72 µg/g, similar a la hallada en este trabajo, pero la muestra fue muy pequeña (n =12)⁶¹.

De forma global, se objetivó también una correlación negativa entre la edad (días) y la CF (µg/g) en el conjunto de lactantes menores de 12 meses (n =153) con el test de Spearman, que dio un coeficiente de -0.383 con significación bilateral (p =0.00).

Esto sugiere la estabilización progresiva de los factores potencialmente influyentes. Es reseñable la mayor amplitud de los RIC en los participantes de menor edad, que parece disminuir posteriormente. Se ha descrito una variación dependiendo del modo de recogida de la muestra, con niveles hasta un 30% más altos de CF en aquellas recogidas del pañal, probablemente por la concentración secundaria a la absorción de agua¹⁴⁵. Esto puede explicar en parte la mayor variabilidad de los valores de CF en los lactantes, aunque la influencia de otros factores aún no conocidos pudiera ser determinante.

6.3.3 NIÑOS DE 12 A 23 MESES

Se observó un leve ascenso de CF en los lactantes de 12 a 23 meses (n =42, CF mediana 97 µg/g, RIC 275) respecto a los de 6 a 11 meses. Este aumento puede tener varias explicaciones. En ese periodo, continúa el proceso de maduración intestinal y aumenta la influencia de las variables ambientales, incluyendo el mayor contacto con

otros niños con el consecuente aumento de exposición a infecciones víricas y bacterianas. Además, en estas edades los patrones nutricionales del lactante se hacen más variados y se van asemejando a los del adulto, lo que puede influir en el desarrollo del sistema inmune y el establecimiento de la microbiota. Sin embargo, la falta de datos sobre la alimentación en los mayores de 6 meses limita la capacidad de este estudio para explorar esta posibilidad.

Resulta difícil comparar nuestros resultados con los de otros autores por la heterogeneidad de las muestras. En el trabajo de Oord *et al.*, que se ajusta a esta misma franja etaria, (n =20), la mediana de CF fue de 47 µg/g, menor que la del presente estudio, que se asemejan más a los de Rugtveit *et al.* (n =19, edad 2 años), con CF mediana 64 µg/g y RIC 29-248 µg/g. El trabajo de Li *et al.* incluye lactantes de 1 a 18 meses (n =42) con cifras más similares a las encontradas en esta muestra (mediana 174 µg/g, RIC 76-334 µg/g)^{61, 146,153}.

6.3.4 MAYORES DE 2 AÑOS

A partir de esta edad se observa una disminución progresiva en las cifras de CF mediana, así como una disminución de la amplitud intercuartil.

En el grupo de 2 a 3 años (n =45) se encontró una CF mediana de 71 µg/g, con un RIC de 130 µg/g. Entre los niños de 4 a 7 años (n =64) la CF mediana fue de 46 µg/g, con un RIC de 89 µg/g. En la franja de 8 a 11 años (n =46), la CF mediana fue de 34.5 µg/g, con un RIC de 48 µg/g. Por último, los niños de 12 a 18 años (n =45), presentaron una CF mediana de 30 µg/g y un RIC de 19 µg/g.

En las publicaciones revisadas, no se encontraron trabajos que analizasen todos estos rangos etarios en una misma población, pero se observó la misma tendencia a la disminución de la CF con la edad. De hecho, a partir de los 4 años, los valores de CF de la muestra del presente trabajo se encuentran por debajo del umbral de 50 µg/g aceptado en adultos y en niños mayores de 4 años^{59,200}.

6.4 CORRELACIÓN ENTRE LA EDAD Y EL NIVEL DE CF

La CF se correlaciona de forma negativa con la edad.

Los valores de CF mostraron una tendencia negativa desde los recién nacidos (con mediana de CF de 303 $\mu\text{g/g}$ y RIC de 202) hasta los lactantes de 6 a 11 meses (mediana 63 $\mu\text{g/g}$, RIC 126), seguido de un nuevo ascenso de las cifras en el grupo de 12 a 23 meses (mediana 97 $\mu\text{g/g}$, RIC 275) y un descenso posterior progresivo en los siguientes grupos de edad. En el total de la muestra se encontró una asociación lineal negativa entre la edad (días) y la CF ($\mu\text{g/g}$) con un coeficiente de correlación de Spearman de -0.603 (IC al 95% de -0.662 a -0.536) con significación bilateral ($p = 0.00$).

Este resultado se corresponde con la tendencia descrita en las publicaciones disponibles hasta el momento. En la Tabla 1 se observa que los estudios realizados en los grupos de menor edad arrojan cifras de CF superiores. De hecho, en los trabajos que analizan varias franjas etarias se objetiva esta relación negativa.

Nissen *et al.* analizaron un grupo de 16 recién nacidos a término sanos de menos de 3 semanas de edad (muestra recogida entre los 3 y 18 días de vida) y los compararon con un grupo de 21 niños sanos (edad media 7 años, rango 1-15 años), encontrando un valores de mediana y RIC de CF de 235 $\mu\text{g/g}$ (172-2880 $\mu\text{g/g}$) y 17 $\mu\text{g/g}$ (7-41 $\mu\text{g/g}$) respectivamente¹⁴⁰.

Rugtveit *et al.* estudiaron 115 sujetos sanos menores de 5 años que acudieron a un control rutinario de salud en Oslo (Noruega) divididos en 6 grupos etarios: 6 semanas ($n = 20$), 3 meses ($n = 20$), 6 meses ($n = 22$), 1 año ($n = 20$), 2 años ($n = 19$) y 5 años ($n = 15$). Observaron una disminución de los valores de CF mediana desde 269 $\mu\text{g/g}$ en el primer

grupo hasta 49 µg/g en el último, y una tendencia a la disminución del RIC, desde 615 en la primera franja etaria hasta 59 en la última¹⁴⁶.

En el estudio de Fagerberg *et al.* con 117 sujetos de entre 4 y 17 años y una mediana de CF de 14 µg/g, se realizó un subanálisis tras dividirlos en 4 grupos etarios: de 4 a 6 años (n =27), de 7 a 10 años (n =30), de 11 a 14 años (n =27) y de 15 a 17 años (n =33), con una tendencia a la disminución de los valores de CF mediana con la edad en los primeros 3 grupos y un leve ascenso en el último (28.2 µg/g, 13.5 µg/g, 9.9 µg/g y 14.6 µg/g respectivamente). El análisis de regresión lineal simple no encontró una correlación significativa entre la edad y la concentración de CF ($r=0.17$). Cabe destacar que el tamaño muestral fue menor que el del presente estudio, y que la inclusión de familiares de los trabajadores del hospital pudo afectar a los resultados⁵⁹.

Hestvik *et al.* publicaron una serie con 54 participantes menores de 1 año y 159 de 4 a 12 años en Kampala (Uganda). Encontraron unas medianas de CF de 249 µg/g y 28 µg/g respectivamente¹⁵⁰, pero se trataba de niños expuestos a factores ambientales, dietéticos y socio-económicos muy distintos a los que viven en nuestro medio.

Oord *et al.* publicaron un análisis de un total de 75 sujetos sanos de 4 guarderías de Aarhus (Dinamarca), así como los familiares del personal del Hospital. Se definió como "sano" el que había estado asintomático en las 2 semanas previas, según el criterio de los padres. Se dividieron en 5 grupos etarios: menos de 6 meses (n =9), de 6 a 12 meses (n =12), de 1 a 2 años (n =20), de 2 a 3 años (n =24) y de 3 a 4 años (n =8). Se observó también un descenso en las medianas de CF de cada grupo, desde 192 µg/g en el primer grupo hasta 36 µg/g en el último⁶¹.

Durante la realización de nuestro estudio, Davidson *et al.* publicaron, en mayo de 2016, una muestra de 87 niños de 1 a 4 años y 636 de 4 a 17.9 años, con unas medianas de CF de 75 µg/g y 40 µg/g respectivamente, y una diferencia entre estos grupos estadísticamente significativa ($p <0.01$)¹⁵⁴. Sin embargo, tal y como se ha comentado, el diseño de este estudio (retrospectivo y con participantes sintomáticos) limita la extrapolación de los resultados a una población pediátrica sana.

Zhu *et al.* analizaron esta misma franja (de 1 a 4 años), con un total de 274 niños sanos que acudieron a sus controles de salud rutinarios. Encontraron una correlación negativa entre la edad y la CF (rho de Spearman = -0.167, $p < 0.01$)¹⁵⁵. Song *et al.* analizaron 234 niños de entre 6 meses y 4 años, y hallaron, también, una correlación negativa (rho de Spearman = -0.44, $p = 0.01$)¹⁵⁶.

Roca *et al.* estudiaron un total de 174 niños asintomáticos de 1 a 12 años divididos en 3 grupos etarios: 67 sujetos de menores de 12 meses, 60 de 1 a 4 años y 47 mayores de 4 años y menores de 12. Se apreció una asociación negativa estadísticamente significativa entre la edad y la concentración de CF ($p < 0.01$)¹⁵¹.

En conclusión, los resultados del presente estudio son concordantes con los publicados por otros autores hasta la fecha, con cifras de CF más altas en los sujetos de menor edad. En cuanto al análisis estadístico de esta asociación, los estudios que aplican el coeficiente de correlación de Spearman como el de Zhu *et al.* y el de Song *et al.* encuentran valores también negativos aunque menores que el de este trabajo, lo que probablemente se deba a la limitación de la franja etaria estudiada^{155,156}.

La disminución progresiva de la CF a lo largo de la edad pediátrica puede deberse a varios factores.

Tal y como se ha mencionado, los valores elevados en neonatos probablemente se deban a la mayor permeabilidad intestinal, el aumento de la migración de leucocitos a través de la mucosa durante el desarrollo del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), el tipo de alimentación y la colonización intestinal. Durante las primeras semanas de vida, los potentes agentes quimiotácticos producidos por la microbiota pueden estimular la migración transepitelial de los granulocitos y dar lugar a una mayor concentración intraluminal de CF como defensa contra los potenciales agentes patógenos invasores. De esta forma, se hipotetiza que más allá de su papel como mediador en la inflamación, la CF puede ejercer un efecto positivo sobre la defensa del huésped en condiciones fisiológicas, como en recién nacidos sanos^{143,144, 162,200-202}.

Todos estos elementos, si bien se dan a lo largo de los primeros meses de vida, posiblemente sean más llamativos en los primeros 30 días. Además, se han identificado valores elevados de CF en el primer meconio, lo que reflejaría la influencia de ciertos factores prenatales^{138,139}.

El posterior descenso de las cifras de CF a medida que aumenta la edad sugiere la estabilización progresiva de las variables potencialmente implicadas. Al alcanzar el año de edad, se considera que se completa la adquisición de la microbiota intestinal, acercándose al perfil de los adultos.

Cabe señalar el hallazgo en este estudio de un leve ascenso de CF en los lactantes de 12 a 23 meses. Como se ha desarrollado previamente, es posible que en este periodo aumente la influencia de variables ambientales como el mayor contacto con otros niños y la exposición a infecciones intercurrentes. Además, en estas edades los patrones nutricionales del lactante se hacen más variados y se van asemejando progresivamente a los del adulto, lo que puede influir en el establecimiento de la microbiota y en el sistema inmune.

Llama la atención la mayor amplitud de los RIC en los participantes de menor edad, que disminuye posteriormente. Las diferencias descritas en función del modo de recogida de la muestra¹⁴⁵ explicarían de forma parcial la mayor variabilidad de los valores de CF en los lactantes, aunque pueden influir otros factores aún no conocidos.

A partir de los 4 años, los valores de mediana de CF de este estudio fueron inferiores al umbral de 50 $\mu\text{g/g}$ aceptado en adultos, en concordancia con otras publicaciones^{59,200} y con menor variación intra-grupo. Esto sugiere que a esta edad la mucosa intestinal alcanza cierto grado de madurez, tal y como apuntan otros autores^{151,203}. Por otra parte, la defensa inmunológica de primera línea, constituida por las inmunoglobulinas de clase A (IgA), no completa su desarrollo hasta los 4 años²⁰⁴. Además, es probable que desde entonces el patrón nutricional se haga semejante al de los adultos y se mantenga más estable que en las etapas del desarrollo previas.

En resumen, parece razonable pensar que todos los factores potencialmente implicados en la maduración intestinal evolucionan desde el periodo prenatal y a lo largo de toda la edad pediátrica de forma continua, interrelacionándose entre ellos mediante mecanismos aún no totalmente dilucidados. Todos estos cambios, más llamativos en los primeros meses de vida, probablemente tiendan a estabilizarse a partir de los 4 años de edad.

En definitiva, la CF, además de tener un papel como mediador en la inflamación, probablemente sirva de reflejo de los procesos madurativos que ocurren en condiciones fisiológicas en los niños sanos.

6.5 CORRELACIÓN ENTRE SEXO Y EL NIVEL DE CF

La CF no se correlaciona con el sexo.

La muestra total ($n = 395$) presentó una distribución por sexos homogénea, con 204 niños (51.6%) y 191 niñas (48.4%). Este porcentaje es similar al registrado en los nacimientos en la Comunidad de Madrid en las últimas décadas (entre 1975 y 2014), en los que anualmente se ha mantenido el porcentaje de recién nacidos niños entre el 51.1 y el 52.1% y el de niñas entre el 47.9 y el 48.9%.

En el total de la muestra, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, en los niveles de CF tal y como se muestra en la Tabla 11, y en la Figura 22.

Esta ausencia de relación se corresponde con lo descrito en la bibliografía. Los estudios de Laforgia *et al.*, Campeotto *et al.*, Lee *et al.*, Liu *et al.*, Hestvik *et al.*, Roca *et al.*, Zhu *et al.*, Song *et al.*, Berni Canani *et al.*, Fagerberg *et al.*, Asgarshirazi *et al.*, Olafsdottir *et al.*, Soto-Méndez *et al.* y Li *et al.* no encuentran diferencias en función del sexo, a pesar de tratarse de estudios con diseños y poblaciones heterogéneos ^{44, 59, 138,}

141, 142, 145, 147, 149–151, 153, 155–157.

6.6 CORRELACIÓN ENTRE LOS FACTORES PERINATALES Y EL NIVEL DE CF

La CF no se correlaciona con ninguno de estos factores.

6.6.1 MODO DE NACIMIENTO

El modo de nacimiento se registró en 391 voluntarios (99% de la muestra). Se produjo por vía vaginal en 293 (74.9%) y mediante cesárea en 98 (25.1%). Los datos se asemejan a los del Instituto de Estadística de la Comunidad de Madrid, donde se registraron en el año 2014 un 72.3% de nacimientos por vía vaginal y un 27.7% por cesárea²⁰⁵. Así mismo, son similares a los obtenidos a nivel nacional según datos publicados por el Ministerio de Sanidad y Política Social. En el año 2005, el 25.2% de los nacimientos en nuestro país se produjo mediante cesárea, porcentaje muy superior al de otros países europeos como Países Bajos (13.6%), Suecia (17.2%) o Bélgica y Francia (17.8%)²⁰⁶. Aumentó hasta un 26.7% en nuestro país en el año 2015, según el registro del Instituto Nacional de Estadística²⁰⁷. Estos datos comparativos aparecen representados en la Figura 32.

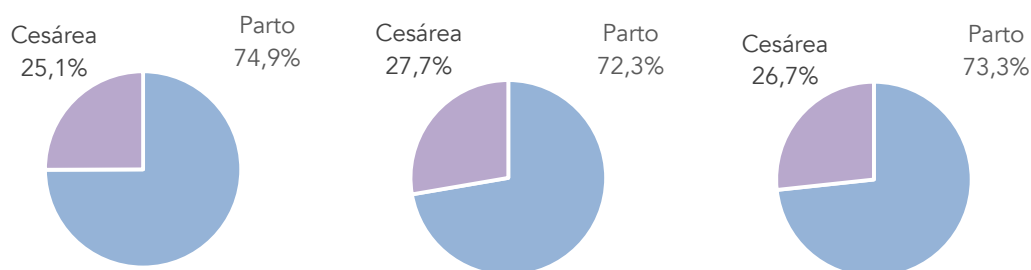


Figura 32: porcentaje de nacimientos por cesárea y parto vaginal en nuestra muestra en 2015-2016 (a), en la Comunidad de Madrid en 2014 (b) y en España en 2015 (c).

Se analizó la posible relación entre el tipo de nacimiento y los niveles de CF, obteniendo los datos que aparecen en la Tabla 13 y en la Figura 24. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas en el total de la muestra ni por grupos etarios.

Nuestros resultados son congruentes con los de otros autores. Laforgia *et al.* estudiaron el meconio de 131 neonatos sin encontrar relación entre el tipo de nacimiento y los niveles de CF¹³⁸. Roca *et al.* no encontraron diferencias en los lactantes de menos de 6 meses (n =51)¹⁵¹. Li *et al.* tampoco identificaron diferencias en los 105 lactantes menores de 6 meses que analizaron¹³³.

Sin embargo, Lee *et al.* analizaron un grupo de 133 lactantes menores de 6 meses y observaron niveles superiores de CF de los nacidos por vía vaginal (n =75) frente a los nacidos por cesárea (n =58)¹⁴⁷.

En general, se acepta que el tracto gastrointestinal fetal es estéril y que, en los primeros días de vida, se coloniza rápidamente por microorganismos, influyendo en el proceso el propio nacimiento. El parto por vía vaginal proporciona un contacto temprano con la microbiota materna y se considera crucial para la maduración intestinal, la programación metabólica e inmunológica y el establecimiento de la homeostasis huésped-microbiota. Aquellos nacidos por parto adquieren una microbiota similar a la flora vaginal materna (con predominio de *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Lactobacillus* etc.), mientras que los nacidos mediante cesárea presentan una flora similar a la hallada en la superficie cutánea materna (dominada por *Staphylococcus*)²⁰⁸⁻²¹¹. Además, algunas publicaciones objetivaron una mayor prevalencia de rinitis alérgica, asma y atopía en aquellos nacidos por cesárea, sugiriendo una relación entre el tipo de nacimiento y el desarrollo posterior de inmunidad^{212,213}.

A pesar de que en los sujetos del presente estudio no se hayan encontrado diferencias en cuanto a la CF, la posible predisposición a una enfermedad inmunológica en aquellos nacidos por cesárea debe de ser investigada, dado el aumento de nacimientos por esta vía y la evidencia acumulada de que la microbiota desempeña un papel fundamental en la conformación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa.

6.6.2 LA EDAD GESTACIONAL

La edad gestacional se registró en 391 voluntarios (99% de la muestra): 344 (88%) habían nacido a término, 34 (8.7%) fueron pretérmino y 13 (3.3%) fueron postérmino. La edad gestacional media fue de 38.7 semanas (IC 95% de 38.4-39.0), con una mediana de 39 semanas. En los datos del Instituto de Estadística de la Comunidad de Madrid, se registraron en el año 2014 un total de 65505 nacimientos, y consta la edad gestacional en 52130. De ellos, 4371 (8,4%) fueron pretérmino, 47134 (90.4%) fueron a término y 621 (1.2%) fueron postérmino²⁰⁵.

A nivel nacional, según los datos del Instituto Nacional de Estadística, en el año 2015 se registraron en España 420290 nacimientos, y consta la edad gestacional en 356204. De éstos, 26935 (7.6%) nacieron con menos de 37 semanas de gestación; 323559 (90.8%) nacieron a término y 5710 (1.6%) nacieron con 42 o más semanas de gestación²⁰⁷. Por todo ello, los datos de este trabajo se asemejan a los de la población general de nuestro medio.

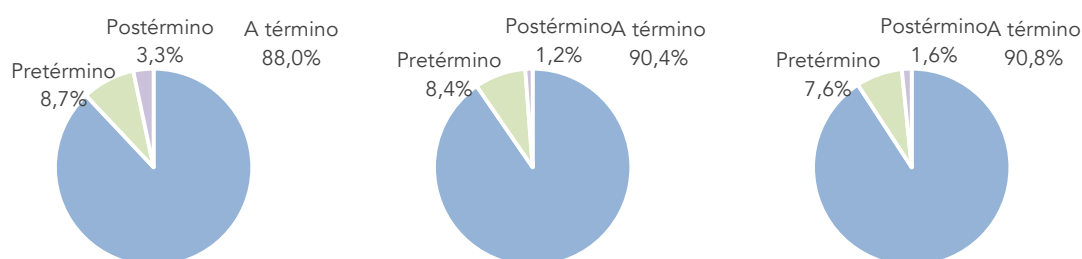


Figura 33: edad gestacional en los nacimientos registrados en el estudio en 2015-2016 (a), en la Comunidad de Madrid en 2014 (b) y en España en 2015 (c).

Se analizó la posible relación entre la edad gestacional y la CF alterada ($>50 \mu\text{g/g}$) o normal ($\leq 50 \mu\text{g/g}$), así como con el nivel de CF como variable cuantitativa en $\mu\text{g/g}$, en 391 sujetos (99%) (ver Tabla 12 y Figura 23). No se encontró relación entre los niveles de CF y la edad gestacional en el total de la muestra ni por grupos etarios.

Los datos publicados en este aspecto son controvertidos, en parte dada la escasez de publicaciones diseñadas específicamente para valorar el papel de la edad gestacional en los niveles de CF. Nissen *et al.* no identificaron diferencias entre los recién nacidos a término (edad gestacional media 39 semanas, rango 37-42) y los pretérmino (edad gestacional media 31 semanas, rango 25-35)¹⁴⁰. Campeotto *et al.* y Josefsson *et al.* no encontraron influencia de la edad gestacional en el grupo de prematuros que analizaron^{51,159}. Sin embargo, Laforgia *et al.* describieron una correlación negativa entre la edad gestacional y la CF ($p < 0.05$, $r = -0.243$) en los 131 neonatos a término y pretérmino estudiados¹³⁸. En la revisión realizada por Kapel *et al.*, llegan a la conclusión de que la edad gestacional no parece influir en los niveles de CF de forma relevante²⁰⁰. Tampoco existe acuerdo en la literatura respecto a la evolución de los niveles de CF en función de la edad postnatal en los recién nacidos prematuros. Zoppelli *et al.* identificaron valores de CF elevados en prematuros con bajo peso, que disminuían de forma homogénea hasta el sexto-octavo día de vida, y posteriormente aumentaban en aquellos con más de 26 semanas de gestación, pero seguían disminuyendo en los menores de esa edad. Sin embargo, en este estudio no se realiza una comparación directa con un grupo control de participantes nacidos a término, por lo que se limita la extrapolación de resultados²¹⁴. Campeotto *et al.*, por otro lado, no observaron una correlación entre la evolución postnatal de los niveles de CF y la edad gestacional en prematuros¹⁵⁹.

Cabe destacar la dificultad en la revisión de los datos sobre este grupo poblacional, ya que algunas de las publicaciones disponibles identifican como prematuros sanos a aquellos no diagnosticados de patología gastrointestinal, pero en ocasiones padecen otras patologías relacionadas con la prematuridad. Sin embargo, se

han objetivado diferencias en la microbiota en función de la edad gestacional. Así, los prematuros tienen un aumento de *Bacillus* frente a la mayor presencia de *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* en los nacidos a término^{211,215}. Esto podría justificar diferencias en la CF como las encontradas por Laforgia *et al.*¹³⁸.

El presente estudio, al no estar específicamente diseñado para valorar el papel de la edad gestacional en la CF, tiene una muestra heterogénea, con un claro predominio de sujetos a término (88%). Solo 34 sujetos (8.7%) fueron pretérmino, y de ellos solo 3 pueden considerarse prematuros extremos (menos de 28 semanas de gestación) y 6 muy prematuros (28 a 32 semanas). Esto limita la extrapolación de sus resultados, por lo que consideramos que la influencia de esta variable en la CF debe estudiarse mediante trabajos diseñados a tal fin.

6.6.3 EL PESO AL NACIMIENTO

Se registró el peso al nacimiento en 392 participantes del total de la muestra (99.2%). La media fue de 3.2 Kg (IC 95% de 3.1 a 3.3 Kg), y la mediana fue de 3.2 Kg. El mínimo peso al nacimiento fue de 750 y el máximo de 4910 g, con un rango de 4160 g. En nuestra muestra, 38 sujetos (9.7%) pesaron menos de 2500 g al nacer, 338 recién nacidos (86.2%) pesaron entre 2500 y 3999 g y 16 (4.1%) pesaron más de 4000 g.

En la Comunidad de Madrid se registró el peso al nacimiento en 60367 neonatos en el año 2014. De ellos, 5292 (8.8%) nacieron con un peso inferior a 2500 g, 52355 (86.7%) pesaron entre 2500 y 3999 g y 2720 (4.5%) pesaron 4000 g o más²⁰⁵. A nivel nacional, según el Instituto Nacional de Estadística, en el año 2015 se registraron en España 420290 nacimientos, y consta el peso al nacimiento en 398789. De éstos, 33194 (8.3%) nacieron con un peso inferior a 2500 g, 343426 (86.1%) pesaron entre 2500 y 3999 g y 22169 (5.6%) pesaron 4000 g o más²¹⁶. Así, puede considerarse que la presente muestra es equiparable a la población española general en este aspecto.

En el presente estudio no se identificó asociación entre el peso al nacimiento y los niveles de CF en el total de la muestra, ni por grupos de edad. Dadas las características del diseño del estudio, los grupos son heterogéneos en este aspecto, con predominio de sujetos de peso considerado como normal (86.2%). Esto puede limitar la extrapolación de sus resultados.

Aún así, la ausencia de relación resulta congruente con los hallazgos de otros investigadores. Liu *et al.*, en un grupo de 144 lactantes, no encontraron diferencias significativas en los niveles de CF en función del peso al nacimiento¹⁴⁹. Li *et al.* tampoco identificaron diferencias en este aspecto en 105 lactantes a término menores de 6 meses¹³³. Zhu *et al.* no identificaron diferencias en los 274 niños de 1 a 4 años que analizaron¹⁵⁵. Sin embargo, Laforgia *et al.* describieron una correlación negativa con el peso al nacimiento en los neonatos estudiados ($p < 0.01$ $r = -0.333$)¹³⁸, por lo que resultaría interesante confirmar estos resultados con trabajos específicamente diseñados.

6.7 CORRELACIÓN ENTRE EL TIPO DE LACTANCIA Y EL NIVEL DE CF

La CF no se correlaciona con la lactancia en menores de 6 meses.

Para valorar la posible influencia del tipo de lactancia en los niveles de CF se acotó el estudio a los menores de 6 meses, en los que la clasificación en grupos, según el tipo de lactancia, es más factible. A partir de esta edad, el inicio de la alimentación complementaria hace que el patrón de comidas sea mucho más heterogéneo y por tanto difícil de analizar. Se recogió esta información en 104 de los 107 menores de 6 meses (97.2%): recibían LM exclusiva 69 lactantes (el 66.4%), lactancia mixta 9 (8.7%) y fórmula de inicio de forma exclusiva 26 (25%).

Los datos publicados en 2016 por UNICEF indican que, globalmente, solo un 43% de los niños continúan recibiendo LM exclusiva a los 6 meses de vida. En Europa, según datos de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) del año 2005, los mejores resultados de inicio de LM los presentaban los países nórdicos con cifras próximas al 100%. La LM exclusiva a los 6 meses disminuía por debajo del 20%, muy lejos del objetivo de la OMS (50% de LME a los 6 meses).

En España disponemos de los datos de las Encuestas Nacionales de Salud (ENS) y de las encuestas específicas sobre lactancia. Según la Encuesta Nacional sobre Hábitos de Lactancia de 2013, se inicia la LM (tanto exclusiva como mixta) en hasta en el 89% de los recién nacidos. Sin embargo, el porcentaje de niños que reciben algún tipo de LM disminuye al 69% a los 3 meses, al 38% a los 4-6 meses y al 33% a los 7-12 meses²¹⁷⁻²¹⁹.

En este trabajo, se observó una tendencia a la asociación positiva de la CF con

la LM. Los valores fueron inferiores en los alimentados con fórmula (274 $\mu\text{g/g}$, RIC 210), intermedios con lactancia mixta (331 $\mu\text{g/g}$, RIC 261) y superiores en los amamantados de forma exclusiva (343 $\mu\text{g/g}$, RIC 392) (ver Tabla 14). Además, cabe apuntar que 6 de los 8 sujetos del total del estudio que tuvieron $\text{CF} \geq 1000 \mu\text{g/g}$ eran lactantes con LM exclusiva. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los 3 grupos ($p = 0.13$). Se estudió este dato en el subgrupo de recién nacidos (menores de 1 mes) y en aquellos de 1 a 5 meses (Tabla 15 y Tabla 16), sin encontrarse diferencias en ellos.

Estos resultados se asemejan a los publicados por otros grupos. Campeotto *et al.* no identificaron diferencias significativas al comparar tres tipos de alimentación: LM, fórmula estándar y fórmula con prebióticos, en una muestra de 69 neonatos a término¹⁴¹. Roca *et al.* no encontraron diferencias en los lactantes de menos de 6 meses ($n = 51$) alimentados con LM exclusiva y fórmula¹⁵¹. Baldasarre *et al.* tampoco identificaron diferencias en los neonatos analizados ($n = 71$)¹⁴³.

Sin embargo, existen varios trabajos que sugieren una posible influencia del tipo de lactancia en los niveles de CF aunque con resultados contradictorios. Golden *et al.* analizaron la CF de 80 lactantes, encontrando niveles inferiores en los alimentados con LM que en los que recibieron fórmula. Las diferencias se mantenían incluso una vez iniciada la alimentación complementaria¹⁶⁰. Los autores se basaron en el posible papel anti-inflamatorio de la leche materna reportado por Goldman *et al.* para justificar este hallazgo¹⁶¹. De hecho, se ha descrito una menor permeabilidad intestinal en los lactantes alimentados con LM^{162,163}. El estudio de Taylor *et al.*, realizado en prematuros, apoya la hipótesis de que la LM podría aportar factores promotores de las “tight junctions”, por lo que los alimentados con fórmula artificial presentarían un aumento de la permeabilidad²²⁰.

Por todo ello, y dado que la elevación de CF refleja diversos procesos patológicos que se producen en la mucosa intestinal de los pacientes pediátricos, parece lógico esperar que sea menor en los lactantes con LM exclusiva.

No obstante, son más los estudios que presentan resultados opuestos. Asgarshirazi et al. describieron niveles de CF superiores en los alimentados con LM exclusiva (n =54) frente a aquellos con fórmula o con lactancia mixta (n =48), con diferencias estadísticamente significativas tanto al mes como a los 6 meses de edad¹⁴². Lee et al. encontraron niveles mayores de CF en los alimentados con LM exclusiva (n =57) frente a aquellos alimentados con fórmula (n =76)¹⁴⁷. Dorosko et al. compararon 41 lactantes con LM exclusiva frente a 21 con lactancia mixta, con niveles de CF superiores en el primer grupo¹⁴⁸. Li et al. también obtuvieron este resultado tras comparar 90 lactantes menores de 12 meses con LM frente a 148 que no recibieron LM¹⁵³. En otro estudio de este mismo grupo, que analizaba lactantes de menos de 6 meses, se observaron niveles de CF superiores en los que recibían LM (n =54) que en los no alimentados con LM (n =51)¹³³. Curiosamente, en nuestra muestra, a pesar de no identificarse una diferencia estadísticamente significativa, se observó una tendencia a la asociación positiva de la CF con la LM, lo que resultaría congruente con estas publicaciones.

Considerando la relación entre la LM y la disminución de la permeabilidad intestinal reportada en varios trabajos^{162,163,220}, la elevación de CF en lactantes amamantados puede deberse a otros factores, como su papel en la microbiota. Los alimentados con LM presentan de forma predominante *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* mientras que los que reciben fórmula artificial presentan un aumento de *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* y *Clostridium*. Además, la leche materna aporta factores (oligosacáridos no metabolizados, lisozima, lactoferrina, anticuerpos y citoquinas, hormonas y factores de crecimiento) que condicionan el medio intestinal y estimulan la proliferación específica de bacterias colonizadoras^{144,211}. Todo ello contribuye al desarrollo normal del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), la síntesis y secreción de IgA, y una respuesta equilibrada de células T auxiliares. Así, los niveles más altos de CF en los lactantes alimentados exclusivamente con LM en comparación con los alimentados con fórmula podrían en realidad reflejar el crecimiento y maduración

fisiológicos de la mucosa intestinal y del sistema inmunitario promovidas por la leche humana^{147,202}.

Kapel *et al.* señalan en su revisión bibliográfica la dificultad para comparar los resultados de los estudios mencionados dadas las diferencias en el diseño, criterios de inclusión y la escasa información sobre los antecedentes perinatales o la composición de la fórmulas artificiales²⁰⁰. En el presente trabajo, como en otros previos, cabe señalar como limitación la imposibilidad de precisar en los participantes con lactancia mixta el porcentaje exacto de fórmula y de leche materna que recibieron, lo que podría aportar información relevante.

En cualquier caso, se necesitan estudios adicionales para aclarar el mecanismo subyacente en la posible relación entre el patrón de alimentación y los niveles de CF en lactantes.

6.8 CORRELACIÓN ENTRE LA ANTROPOMETRÍA Y EL NIVEL DE CF

No se observó una correlación entre el peso y la CF.

Se observó una correlación negativa entre la talla y la CF.

No se observó una correlación entre el IMC y la CF.

Los datos antropométricos de peso, talla e IMC se registraron en más 95% de los sujetos de la muestra. Se calculó además la desviación estándar (DE) de peso, talla e IMC de cada sujeto según las tablas de Carrascosa *et al.* (2010) para controlar el posible papel de la edad como factor de confusión. Se eligió esta referencia por ser la más reciente en población española, y agrupar los resultados de los estudios transversales realizados en diferentes comunidades de nuestro país²²¹.

La DE media del peso y la talla en el total de la muestra es de -0.3, y la de IMC de -0.2, lo que se ajusta, de forma global, a la distribución de la población española de las mismas edades.

Sin embargo, cabe destacar la dificultad para valorar los datos antropométricos de todos los sujetos de forma conjunta por tratarse de diferentes grupos etarios pediátricos. En los menores de 2 años se recomienda la valoración del peso para la talla como referencia, y a partir de esa edad, el IMC. No obstante, algunas publicaciones recientes sugieren la existencia de una correlación aceptable entre estos dos índices también en los menores de 2 años²²².

Para el estudio estadístico, se decidió optar por el IMC en el total de la muestra para poder aplicar un índice de referencia común. Además, tal y como se refleja en

cada apartado, se realizó un análisis multivariante *post hoc* para poder controlar la edad como posible variable de confusión.

6.8.1 EL PESO

Se encontró una correlación negativa entre la variable predictora cuantitativa peso (Kg) y la variable dependiente cuantitativa CF ($\mu\text{g/g}$) que en el análisis por subgrupos solo se observó en los lactantes de 1 a 6 meses. No se encontró correlación entre la variable peso en DE y la CF ($\mu\text{g/g}$), con un coeficiente de correlación de Spearman de -0.067 ($p > 0.05$).

El análisis multivariante *post hoc* permitió controlar la edad como posible variable de confusión. Se obtuvo un coeficiente mayor del 10% respecto al del análisis univariante, por lo que se asumió como correcta la significación hallada en el análisis multivariante que fue 0.58 ($p > 0.05$), lo que sugirió la ausencia de asociación relación entre el peso y la CF.

6.8.2 LA TALLA

Se encontró una correlación negativa entre la variable independiente cuantitativa talla (cm) y la variable dependiente cuantitativa CF ($\mu\text{g/g}$). Al realizar el mismo análisis en cada franja de edad, en los grupos de 1 a 6 meses, de 2 a 4 años y de 4 a 8 años también se observó esta relación negativa significativa.

Se encontró además una correlación negativa entre la variable independiente cuantitativa talla en DE y la variable dependiente cuantitativa CF ($\mu\text{g/g}$) (Figura 27).

Para corregir la edad como posible factor de confusión, se realizó el análisis multivariante *post hoc* con hallazgo de un coeficiente mayor del 10% respecto al del análisis univariante. Se asumió como correcta la significación hallada en el análisis

multivariante que fue 0.02 ($p < 0.05$), lo que sugirió la existencia una correlación negativa entre la talla y la CF.

6.8.3 EL IMC

En el conjunto de la muestra se encontró una correlación negativa entre la variable independiente cuantitativa IMC (Kg/m^2) y la variable dependiente cuantitativa CF ($\mu\text{g/g}$). En el análisis por edades, solo se encontró asociación en el grupo de recién nacidos (de 0 a 1 mes), con coeficiente de correlación de Spearman de 0.393, lo que indica una relación positiva entre las variables IMC (Kg/m^2) y CF ($\mu\text{g/g}$).

Sin embargo, al analizar la correlación entre la variable independiente cuantitativa IMC en DE y la variable dependiente cuantitativa CF ($\mu\text{g/g}$), se obtuvo un coeficiente de correlación de Spearman de -0.029 ($p > 0.05$), lo que sugiere la ausencia de correlación entre ambas variables.

En un análisis multivariante *post hoc*, para corregir la edad como posible factor de confusión, se obtuvo un coeficiente mayor del 10 % respecto al análisis univariante, por lo que se asumió como correcta la significación hallada en el análisis multivariante que fue 0.33 ($p > 0.05$). Por ello se concluyó que no se encontraba relación entre el IMC y la CF.

La aparente relación negativa, tanto del peso como del IMC con la CF probablemente se deba a la influencia de la edad. En ambos casos, el análisis multivariante permitió eliminar el papel de la edad como variable de confusión, mostrando una ausencia de relación entre estos datos antropométricos y la CF. No obstante, se identificó una asociación negativa entre la talla y la CF que se comprobó tras el análisis multivariante.

Los datos disponibles sobre la influencia de la antropometría en la CF son

escasos y poco claros. Liu *et al.* compararon los niveles de CF en lactantes sanos de 5 a 7 meses en función de su procedencia rural ($n = 105$) o urbana ($n = 39$), objetivando niveles más altos en el primer grupo. Tomando como referencia el valor de CF de $350 \mu\text{g/g}$ sugerido por Ezri *et al.* para el primer año de vida¹⁶⁴, se objetivó que aquellos con cifras superiores tuvieron datos antropométricos significativamente menores ($p < 0.05$). El análisis de regresión lineal de los datos de los sujetos de medio rural indicó que la relación del Z-score de talla para la edad y CF fue inversa y significativa ($p < 0.05$). Sin embargo, los autores insisten en el carácter piloto y exploratorio del estudio, cuyo tamaño muestral fue limitado por razones prácticas¹⁴⁹.

Campbell *et al.* plantearon la hipótesis de que la alteración de la permeabilidad intestinal se asociaba al retraso del crecimiento, y por ello en los niños con menor peso se encontrarían mayores niveles de CF¹⁶⁵. Esta hipótesis se ve apoyada por el trabajo de Li *et al.*, que encontraron una correlación negativa de los Z-score de peso para la edad y peso para la talla y la CF en niños chinos de 1 a 18 meses ($n = 288$)¹⁵³. Sin embargo, Zhu *et al.* no encontraron esta relación en su muestra de 274 niños chinos de 1 a 4 años¹⁵⁵. Soto-Méndez *et al.*, en su estudio de 87 sujetos de 2 a 7 de años de Guatemala, tampoco objetivaron esta asociación¹⁵⁷.

También se ha estudiado la posible relación con la obesidad, partiendo de la premisa de que esta se asocia con un estado de inflamación sistémica crónica^{223–228}. Se han descrito tanto en modelos animales como en humanos con obesidad determinadas alteraciones en las células de Paneth, que forman parte del epitelio de la mucosa intestinal y tienen un importante papel en la protección del tracto gastrointestinal y en la prevención de la translocación de bacterias comensales y patogénicas^{12,229,230}. Por ello, parece razonable pensar que en sujetos con obesidad pueda darse también cierto grado de inflamación intestinal que se refleje en un aumento de CF. Sin embargo, habría que considerar que determinados factores como el tipo de alimentación, el sedentarismo e incluso el tipo de microbiota están estrechamente relacionados con la obesidad y podrían causar de forma independiente un estado inflamatorio que se vería reflejado en la CF²³¹.

Así, Poullis et al. demostraron en una muestra de 300 adultos de 50 a 70 años que los niveles de CF se relacionaban de forma significativa con la obesidad, la baja ingesta de fibra y la falta de ejercicio físico³⁸.

Verdam et al. estudiaron 28 adultos y encontraron que la CF se alteraba en aquellos con el patrón de microbiota relacionado con la obesidad (con una disminución del ratio *Bacteroidetes/Firmicutes*). En este grupo se encontró también una elevación de la PCR, lo que sugiere cierto grado de inflamación intestinal y sistémico²³². Kant et al. analizaron un grupo de 40 adultos con IMC >25 kg/m², sin encontrar una correlación significativa entre el nivel de CF y el IMC individual basal. Además, observaron que en los individuos con CF basal elevada (>50 µg/g), la pérdida de peso mediante dieta y ejercicio produjo una reducción en los niveles de CF (llegando hasta un tercio del basal) a las 11-15 semanas de seguimiento. Esta reducción no se observó en los que tenían CF basal normal, a pesar de conseguir una reducción de peso media similar en ambos grupos¹⁶⁷.

Los datos disponibles en población pediátrica son escasos. Gøbel et al. llevaron a cabo un estudio de doble ciego controlado con placebo en el que incluyeron 50 adolescentes obesos a los que se les administraba la cepa de probiótico *Lactobacillus salivarius* Ls-33 o placebo. Ambos grupos presentaban de forma basal niveles de CF normales para su edad (<50 µg/g) y esta disminuyó, de forma no significativa, en ambos conjuntos, sin diferencias entre ellos, luego las conclusiones son muy débiles. El resto de marcadores de inflamación tampoco se vieron afectados²³³. Considerando que los efectos de los probióticos son con frecuencia específicos para cada cepa, los autores concluyen que no puede excluirse la posibilidad de que otras puedan tener efectos beneficiosos. Spagnulo et al. estudiaron a 34 niños obesos con una edad media de 10.8±3.4 años y con una media de Z-scores de IMC de 2.69 ±0.53, en los que hallaron una correlación significativa entre el Z-score de IMC y los niveles de CF¹⁶⁸.

Existen varias hipótesis para explicar los mecanismos por los que estos factores ambientales alteran la CF. La baja ingesta de fibra parece relacionarse con un aumento

de los marcadores inflamatorios circulantes, probablemente mediante la alteración de la flora intestinal o la densidad de nutrientes. La influencia de la actividad física probablemente se deba al aumento del tono vagal, que tiene un efecto antiinflamatorio a nivel intestinal, o bien a la reducción del tono simpático secundaria, lo que también reduce la inflamación. Además, el ejercicio físico ha demostrado alterar la flora intestinal con efectos positivos^{234,235}.

Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que un aumento de la permeabilidad intestinal puede reflejarse en unos niveles más altos de CF y causar una alteración en el crecimiento, y una menor talla para la edad. Sin embargo, consideramos que esta teoría debería explorarse en estudios prospectivos diseñados específicamente y comprobar, mediante el seguimiento, su influencia en la velocidad de crecimiento.

6.9 CORRELACIÓN ENTRE LA MEDICACIÓN RECIBIDA Y EL NIVEL DE CF

No se objetiva una relación entre los tratamientos permitidos en el estudio y el nivel de CF.

La toma de algunos fármacos en los 15 días previos supuso un criterio de exclusión, tal y como se explica en el apartado correspondiente, pero los que habían recibido otros tratamientos fueron incluidos en el estudio. Se dividió a los 395 voluntarios (100%) en 3 categorías: los que no habían recibido ninguna mediación (348 sujetos, 88.1%), los que habían recibido vitamina D (32 sujetos, 8.1%) y los que habían recibido otra medicación (15 sujetos, 3.8%), que se especifica en la Tabla 18.

El gran número de participantes en el estudio que recibían suplementos de vitamina D se debe a su prescripción siguiendo las recomendaciones de la Asociación Española de Pediatría, que recomienda administrar a los menores de un año alimentados al pecho 400 UI/día. Se inicia en los primeros días de vida y se mantiene hasta que, después del destete, el niño consuma 1 litro diario de fórmula adaptada enriquecida. Además, se aconseja que todos los menores de un año alimentados con fórmula que ingieran menos de 1 litro diario reciban un suplemento de 400 UI/día²³⁶.

En este trabajo, la mayoría de los sujetos que recibían vitamina D tenían menos de 2 años (31/32), y solamente uno de ellos era mayor de esa edad.

Fue llamativo el hecho de que 73 lactantes menores de 12 meses recibieran LM como único aporte de leche, y solo 29 tomaran suplementos de vitamina D. Probablemente se deba a que los padres no consideraran la vitamina D como un medicamento al completar el cuestionario, lo que pudo originar un sesgo de reporte.

Se revisó en la bibliografía disponible si los fármacos que habían tomado los otros 15 sujetos podrían producir alteraciones intestinales que alterasen los resultados de CF. En ninguno de los ellos se ha reconocido dicho efecto, por lo que se mantuvieron en el estudio.

Cabe destacar la no exclusión de los participantes que tomaron laxantes, al tratarse todos ellos de Polietilenglicol (PEG) con o sin electrolitos (Movicol® o Casenlax®) y carbonato de Magnesio (Eupeptina®). Son los recomendados en las guías europeas por su seguridad y tolerancia en pediatría, y no producen las lesiones celulares descritas tras el uso de laxantes estimulantes como senósidos o bisacodilo^{237,238}.

Se observaron mayores cifras de CF en aquellos que tomaron Vitamina D (Figura 29). En el análisis *post hoc* (comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé), los sujetos que recibieron vitamina D presentaron un nivel de CF mayor ($p < 0.05$) frente a los que tomaron otros fármacos o ninguno.

Al realizar este análisis por grupos de edad (Tabla 18), no se encontraron en ninguno de ellos diferencias estadísticamente significativas por lo que parece razonable considerar el papel de la edad como factor de confusión. Los sujetos que tomaban vitamina D son mayoritariamente los menores de 12 meses, por lo que es probable que la elevación de CF se deba más a la edad que a la toma de este suplemento.

6.10 CORRELACIÓN ENTRE LA ASISTENCIA A CENTRO ESCOLAR Y EL NIVEL DE CF

No se objetivó una clara relación entre la asistencia a centro escolar y el nivel de CF.

Una parte importante de los sujetos no asistían a guardería ni colegio o instituto en el momento de su inclusión en el estudio (186 participantes, 47.1%), 157 asistían al colegio/instituto (39.7%) y 52 a guardería (13.2%).

Los datos reflejan las características etarias de la muestra. Como era esperable, en el grupo de recién nacidos (menores de 1 mes), ninguno de los sujetos acudía a guardería. Así mismo, en los grupos de 8 a 11 y de 12 a 18 años, todos los participantes acudían a colegio o instituto. En el conjunto de la muestra se confirmó que todos los niños entre 6 y 16 años estaban escolarizados, como corresponde al cumplimiento de las dos etapas de educación obligatorias en nuestro país. La Educación Primaria, incluye a los niños de 6 a 12 años, y la Educación Secundaria Obligatoria (ESO), de 12 a 16²³⁹.

En el total de la muestra, se objetivó una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de CF de sujetos que asistían a centro escolar frente a los que no, con valores menores en los primeros (Tabla 19 y Figura 30). Sin embargo, al analizar este dato por grupos etarios solo se mantiene una diferencia en el grupo de 12 a 23 meses, con valores de CF mayores en los que acuden a guardería.

Estos resultados señalan de nuevo a la edad como posible factor de confusión. En el total de la muestra, los sujetos con cifras más altas de CF son los menores de un año, que son a su vez lo que menos acuden a guarderías o centros escolares. Al analizar cada franja etaria, sin embargo, solo se objetivó una diferencia significativa en el grupo de 12 a 23 meses, con aumento de CF en aquellos que asisten a guardería ($n=14$, CF

Limitaciones

mediana 298 $\mu\text{g/g}$) frente a los que no ($n = 28$, CF mediana 124 $\mu\text{g/g}$). Esto puede explicarse por la mayor exposición a infecciones intercurrentes de este grupo, con la consecuente influencia en los niveles de CF.

7 LIMITACIONES

Este trabajo presenta las siguientes limitaciones:

1. Se ha definido como sujeto sano aquel que además de ajustarse a la definición de la OMS¹⁹², no presentaba ninguno de los criterios de exclusión detallados. No obstante, para determinar con certeza la ausencia de patología deberían llevarse a cabo otras pruebas complementarias como análisis de sangre o endoscopia digestiva. Someter a las mismas a voluntarios asintomáticos sería éticamente cuestionable.
2. El hecho de estudiar a niños sanos implicó que algunas de las variables analizadas como la edad gestacional o el modo de nacimiento no se distribuyeran de forma homogénea en la muestra, lo que puede dificultar la extracción de conclusiones sobre la influencia de dichos factores.
3. La prueba utilizada presentaba un rango de detección de CF entre 30 y 1000 $\mu\text{g/g}$, por lo que los niveles superiores a 1000 $\mu\text{g/g}$ no pudieron ser determinados con exactitud y fueron analizados como 1000 $\mu\text{g/g}$. Sin embargo, dado que solo hubo 8 casos en el total de la muestra afectados por este hecho, su influencia en los resultados no se consideró relevante.
4. Se trata de un estudio transversal, por lo que los niveles de CF no fueron monitorizados de forma dinámica. No obstante, todos los sujetos con CF superior a 50 $\mu\text{g/g}$ recibieron una llamada telefónica de seguimiento y ninguno de ellos manifestó la aparición de síntomas gastrointestinales. Además, 6 de los 8 los participantes con CF mayor de 1000 $\mu\text{g/g}$ pudieron ser contactados vía telefónica a los 2 años de la realización del estudio, y todos ellos refirieron seguir asintomáticos y con adecuado desarrollo ponderoestatural.

5. Este trabajo se desarrolla en un entorno potencialmente monocultural y con unas características demográficas y socioeconómicas homogéneas, por lo que los resultados serían en principio solo extrapolables a poblaciones similares a la nuestra.
6. Por último, cabe señalar como posible limitación la propia inespecificidad de la CF como marcador de inflamación, por lo que puede encontrarse alterada en un niño sano por otros factores no contemplados. Esta característica determina la necesidad de profundizar en su conocimiento, de forma que, mediante trabajos como el presente, se puedan precisar los factores que puedan influir en ella, así como los valores de normalidad en cada edad pediátrica.

8 CONCLUSIONES

Conclusiones

De este trabajo pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. Este es el primer estudio que describe los valores de CF y analiza posibles factores influyentes en una población de niños sanos de 0 a 18 años.
2. En el total de participantes ($n = 395$), la mediana de CF fue de $77 \mu\text{g/g}$ (RIC 246). Esta cifra es superior al punto de corte considerado como alterado para adultos ($50 \mu\text{g/g}$).
3. Los valores de CF no mostraron una distribución normal, con cifras particularmente elevadas en los neonatos y en los lactantes de 1 a 6 meses (mediana de CF de 303 y $325.5 \mu\text{g/g}$ respectivamente). Estas cifras superan incluso el punto de corte de $250 \mu\text{g/g}$, aceptado como indicador de la presencia de inflamación mucosa en pacientes pediátricos con colitis ulcerosa.
4. Los niveles de CF ($\mu\text{g/g}$) mostraron una correlación negativa con la edad (días), con un coeficiente de correlación de Spearman de -0.603 (IC 95% de -0.662 a -0.536), con significación estadística bilateral.
5. No se encontraron diferencias en función del sexo respecto a la CF.
6. No se halló asociación entre las variables edad gestacional, tipo de parto o peso al nacimiento con la CF.
7. Se identificó una tendencia a la asociación positiva no estadísticamente significativa de la CF con la lactancia materna en los menores de 6 meses. Los valores fueron inferiores en los alimentados con fórmula ($274 \mu\text{g/g}$, RIC 210), intermedios en lactancia mixta ($331 \mu\text{g/g}$, RIC 261) y superiores en los amamantados de forma exclusiva ($343 \mu\text{g/g}$, RIC 392).

Conclusiones

8. No se encontró asociación entre la DE de peso o de IMC y la CF. Se observó una correlación negativa estadísticamente significativa entre la DE de talla y la CF, resultado que se ratificó tras el análisis multivariante *post hoc* controlando la variable edad como factor de confusión. Este hallazgo debe ser confirmado en estudios posteriores diseñados a tal fin, en los que sería útil un modelo prospectivo que permita valorar además la velocidad de crecimiento.
9. No se encontró una clara asociación entre la toma de medicación o la asistencia a centro escolar y el nivel de CF. El análisis de los resultados sugiere en ambos casos el papel de la edad como variable de confusión asociada.
10. Este trabajo aporta nuevos datos sobre la CF, un biomarcador de inflamación intestinal no invasivo muy útil en el estudio de los pacientes pediátricos con cuadros gastrointestinales. Los resultados sugieren que los valores de referencia utilizados hoy en día en este grupo poblacional deben ser replanteados, especialmente en los niños más pequeños, y que debe analizarse la posible influencia de otros factores. Esto ayudaría no solo a seleccionar los pacientes que requieran un estudio más exhaustivo, sino que limitaría la realización de pruebas invasivas en los niños que no las precisen, con la consecuente disminución de molestias para el paciente y optimización de recursos disponibles.

9.1 PARTICIPANTES EXCLUIDOS

De los 426 participantes reclutados se suprimieron 43 del análisis inicial por cumplir alguno de los criterios de exclusión.

La causa más frecuente fue el hallazgo positivo en el estudio microbiológico de la muestra de heces (28 participantes). En otros casos, en la llamada realizada a los padres o tutores tras el hallazgo de un valor de CF >50 µg/g, refirieron cumplir alguno de los criterios previamente mencionados, que no habían sido registrados en el momento del reclutamiento. Entre ellos, destaca la ingesta de los fármacos especificados (9 sujetos), la presencia de síntomas digestivos (3) o el antecedente de patología intestinal (3). Las causas aparecen detalladas en la Tabla 20.

Criterio de exclusión inicial	Número de sujetos excluidos inicialmente (total 43)	Número de sujetos reclutados en un segundo tiempo (total 12)
Diagnóstico previo excluyente (3)		
APLV	3	0 (no es posible recaptar en otro momento)
Hallazgo positivo en el estudio microbiológico de la muestra de heces (28)		
Disbacteriosis intestinal	10	5
Parásitos (Giardia)	8	0
Oxiuros	2	0
Campylobacter	3	3
Salmonella serogrupo B o D	3	1
Adenovirus	1	1
Rotavirus y adenovirus	1	1
Síntomas digestivos en los 30 días previos a la recogida de la muestra (3)		
Dolor abdominal	1	0
Vómitos	1	0
Cólicos	1	0
Ingesta de fármacos en los 15 días previos a la recogida de la muestra (9)		

Antibioterapia	2 *	0
Ibuprofeno	5 *	1
Estilsona	1	0
Omeprazol	1	0
Valganciclovir	1	0

Tabla 20: participantes excluidos del estudio inicialmente, clasificados según el motivo de la exclusión, y participantes que pudieron ser recaptados para el estudio en un segundo tiempo. APLV: alergia a las proteínas de leche de vaca.* Uno de los dos participantes excluidos por toma de antibioterapia fue también excluido por toma de Ibuprofeno, por lo que aparece en ambas categorías.

De los participantes eliminados, 3 padecían APLV. Dado que este diagnóstico es un criterio de exclusión absoluto, no pudieron captarse en un segundo tiempo para el estudio.

De los 40 participantes que cumplían criterios de exclusión relativos se consiguió contactar con los padres de 32. En los 8 casos restantes no se disponía de número de teléfono, este era erróneo o no hubo respuesta a las llamadas. En los casos en los que se contactó con los familiares, se explicó la causa de exclusión y se solicitó la entrega de una segunda muestra transcurrido el tiempo indicado. La segunda muestra se consiguió en 12 participantes que fueron incluidos de nuevo en el estudio.

Los 28 sujetos excluidos del análisis inicial por un hallazgo microbiológico equivaldrían a un 6.8% de los 411 participantes reclutados sin enfermedad de base, asintomáticos, y sin tratamiento en el momento de la recogida de la muestra.

9.1.1 EXCLUIDOS POR ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA

Uno de los 3 participantes excluidos por este motivo fue diagnosticado previamente y recibía una dieta con exclusión de proteínas de leche de vaca (con fórmula extensamente hidrolizada como sustituto de la fórmula de inicio habitual) en el momento de la recogida de la muestra. Los otros dos fueron diagnosticados durante la

realización del estudio y se indicó el cambio a fórmula extensamente hidrolizada 2 y 4 semanas después de la recogida de la muestra respectivamente.

9.1.2 EXCLUIDOS POR HALLAZGO DE DISBACTERIOSIS INTESTINAL

En nuestra muestra se identificaron 10 sujetos con disbacteriosis (2.4%), y solo 3 de ellos eran mayores de 1 año. Por ello, puede considerarse que el resto aún no había completado el proceso de colonización como corresponde a su edad. De los 10 con disbacteriosis, 6 fueron recién nacidos alimentados LM exclusiva en el momento del estudio. De los 4 restantes, solo 1 recibía fórmula de forma exclusiva. Todos los niños de este grupo nacieron a término, 8 de ellos por vía vaginal. La mayoría de los participantes de este subgrupo (7 en total, un 70%), no acudía a guardería ni colegio/instituto, entre los que se encuentran los 6 neonatos.

En 5 de los 10 con disbacteriosis se realizó un segundo estudio de heces en el que presentaron una flora normal, sin haber realizado ninguna intervención terapéutica. En los otros 5 participantes no se realizó la segunda determinación por negación de los padres o por no haber podido contactar con ellos por vía telefónica. Los resultados se especifican en la Tabla 21.

Número identificativo de sujeto excluido	Edad	Sexo	Acude a guardería o colegio/instituto	Hermanos menores de 5 años	Edad gestacional (semanas)	Tipo de Parto	Semanas de LM exclusiva
3*	4 meses 27 días	H	No	0	37	V	12 sem
9*	15 días	H	No	1	40	V	LM (a)
10	28 días	H	No	0	39	V	LM (a)
13	7 días	M	No	1	38	C	LM (a)
14	2 años 1 mes	M	Sí	1	39	C	16 sem

Anexos

20*	15 días	M	No	1	40	V	LM (a)
22	24 días	M	No	1	39	V	LM (a)
33*	7 días	M	No	0	39	V	LM (a)
34*	5 años 3 meses	H	Sí	1	40	V	0 sem (recibió LM mixta)
35	4 años 2 meses	H	Sí	1	41	V	0 sem

Tabla 21: participantes con hallazgo de disbacteriosis intestinal en el estudio de heces. *Sujetos en los que se analizó una segunda muestra con hallazgo de flora intestinal normal. H: hombre, M: mujer. V: vaginal, C: cesárea. LM: lactancia materna, LM (a): lactancia materna actual (en el momento del estudio)

El término “microbiota” intestinal se refiere al conjunto de microorganismos que habitan en el intestino humano, que alcanza una cifra de unos 100 trillones (10^{14}). Favorece la fermentación de algunos alimentos, regula el gasto energético, actúa como barrera frente a los patógenos presentes en los alimentos y colabora en la maduración y mantenimiento del sistema inmune²⁴⁰. Es diferente entre individuos y cambia a lo largo de la primera infancia (Figura 34). En este proceso influyen variables como la edad gestacional, el tipo de nacimiento, el uso de antibioterapia en el periodo neonatal, o el tipo de lactancia^{144, 210,211,215}.

Así, en las condiciones ideales, un recién nacido por parto eutócico, a término, que se alimente con LM exclusiva los primeros 6 meses y no reciba antibioterapia completará esta colonización durante el primer año de vida²⁴¹. A los 3 años, alcanzará una composición similar a la de los adultos y se mantendrá más o menos estable hasta la senectud, cuando se producirán nuevos cambios^{211,240}.

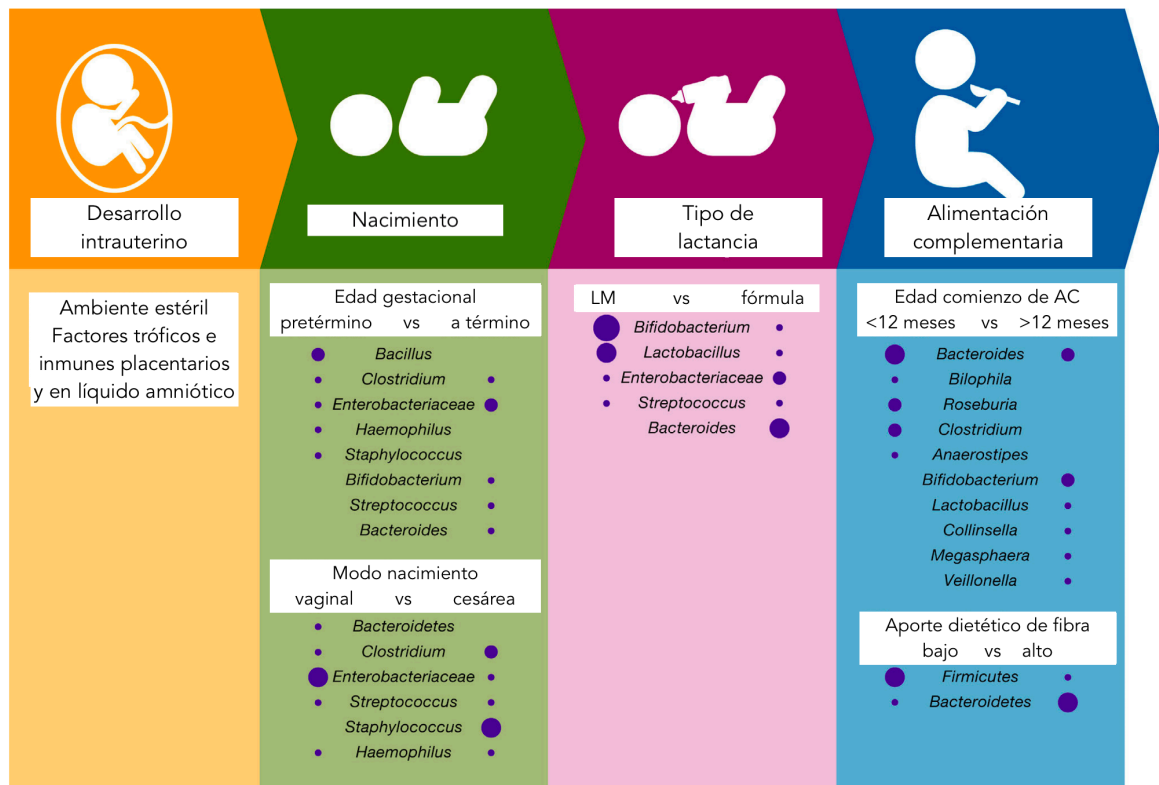


Figura 34: cambios en la composición de la microbiota intestinal a lo largo de los primeros años de vida, e influencia de distintos factores. El tamaño del círculo es proporcional a la abundancia relativa de cada microorganismo. LM: lactancia materna. AC: alimentación complementaria. Adaptado de referencia²¹¹.

La disbacteriosis puede definirse como un cambio o desequilibrio en la composición, función e interacción con el huésped de la microbiota intestinal respecto a la encontrada en individuos sanos. Estas variaciones pueden darse como respuesta adecuada a alguna alteración sufrida en el huésped, o representar un epifenómeno sin implicaciones patológicas. Se deben a factores externos e internos del huésped (dieta, medicación, inmadurez del sistema inmune y otros). Se clasifican según la alteración predominante en 3 tipos. El primero sería la expansión de microorganismos patógenos o potencialmente dañinos, el segundo, la pérdida de la diversidad y el tercero, la pérdida de microorganismos beneficiosos (Figura 35).

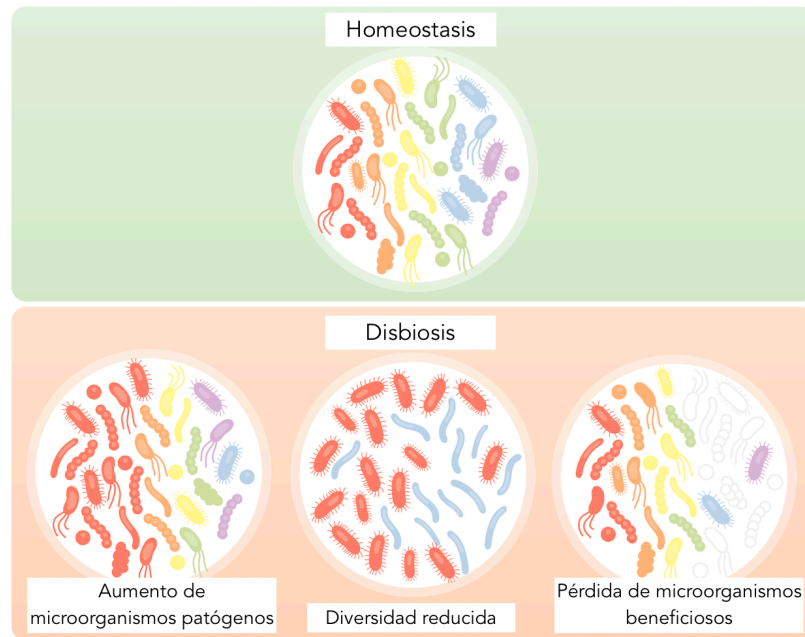


Figura 35: la alteración de las condiciones de homeostasis de la microbiota puede dar lugar al estado de disbiosis. Adaptado de referencia²⁴².

Algunos estudios sugieren que las alteraciones en la flora intestinal pueden influir en la patogénesis de ciertas enfermedades como la EII, así como en cuadros de patología funcional, lo que plantea interesantes posibilidades terapéuticas que probablemente sean exploradas en los próximos años^{250–253}.

9.1.3 EXCLUIDOS POR HALLAZGO DE PARÁSITOS

Se detectó la presencia del parásito *Giardia lamblia* en 8 participantes (equivalente a un 2% de los 411). De ellos, el 87.5% (7) acudían a guardería o a centro escolar, y el 62.5% (5) convivían con un hermano menor de 5 años. En este grupo hay dos parejas de hermanos (los sujetos 27 y 28 y los sujetos 29 y 30). A pesar de haber contactado por vía telefónica con los padres de los 8 participantes y haber solicitado la entrega de una segunda muestra de heces, no se recibió ninguna de ellas por distintos motivos. Los datos de este subgrupo constan en la Tabla 22.

Número identificativo de sujeto excluido	Edad	Sexo	Acude a guardería o colegio/instituto	Hermanos menores de 5 años
1	2 años 8 meses	Mujer	Sí	1
7	1 año 10 meses	Hombre	No	0
21	2 años 10 meses	Hombre	Sí	1
24	14 años 7 meses	Mujer	Sí	0
27	3 años 10 meses	Hombre	Sí	1
28	5 años 0 meses	Mujer	Sí	1
29	8 años 1 mes	Hombre	Sí	1
30	4 años 2 meses	Hombre	Sí	0

Tabla 22: participantes con hallazgo de *G. lamblia* en el estudio de heces.

La *G. lamblia* (también conocida como *G. intestinalis* o *G. duodenalis*) es uno de los parásitos que con más frecuencia produce infecciones intestinales en la edad pediátrica, especialmente en los menores de 2 años que habitan en medios de escasos recursos. Se transmite por vía feco-oral o directa, frecuentemente por el agua contaminada, por contacto directo con estos animales o escasa higiene personal. Esto explica en parte su gran prevalencia en países en desarrollo, donde el acceso al agua salubre no está garantizado y donde es frecuente el contacto con animales como aves de corral que pueden estar infectados²⁴³.

G. lamblia es el agente etiológico de la giardiasis, una infección gastrointestinal que cursa sin síntomas en la mayoría de los casos (60%) pero puede producir un cuadro de diarrea, con o sin sangre o dolor abdominal que llegue a ser grave y/o crónico^{244,245}. En nuestro medio, además de identificarse como causante de la denominada "diarrea del viajero", es frecuente entre lactantes y niños menores de 5 años. Estos son especialmente susceptibles a la transmisión feco-oral de infecciones, por la inmadurez de sus sistemas inmunes y sus deficientes hábitos higiénicos, con un continuo contacto mano-boca. La convivencia con otros niños en espacios reducidos puede favorecer la rápida propagación de estas infecciones. Hay estudios que describen una alta

prevalencia de infecciones por este y otros parásitos en niños que acuden a guarderías, centros escolares o conviven con otros niños, en países desarrollados como Reino Unido (prevalencia del 1.3% entre niños asintomáticos) u Holanda (prevalencia del 4.5% entre niños que acuden a guardería)^{244,246}.

En España se describe una prevalencia de infección por *G.lamblia* en población pediátrica de entre el 3 y el 25%. En uno de los municipios de la Comunidad de Madrid se identificó en el 15.5% de niños menores de 2 años que acudían a guardería²⁴⁷. Los estudios mencionados se refieren a niños tanto sintomáticos como asintomáticos, aunque hay un claro predominio del segundo grupo.

En la muestra de este trabajo, se describe una prevalencia global de un 1.9% de niños con infección por *G. lamblia* (8 pacientes de los 420 participantes reclutados sin otra patología de base y sin síntomas), 6 de ellos de edad igual o menor a 5 años. Esta sería una prevalencia menor a la referida en otros estudios, que puede deberse a varios factores. El primero es el tratarse de una muestra de sujetos asintomáticos. El segundo es tipo de prueba de cribado utilizada (microscopía convencional, que puede no detectar infecciones de baja intensidad). El tercero es el estudiar una única muestra de heces por cada participante, lo que puede disminuir el número de casos detectados.

Los familiares y los pediatras de los sujetos del estudio con este hallazgo fueron informados del resultado. Dada la ausencia de sintomatología, no recibieron tratamiento.

Se identificaron así mismo Oxiuros en las muestras de heces de dos niñas (hermanas), lo que equivaldría a un 0.5% de los 420 participantes reclutados sin otra patología de base y sin síntomas. Acudían a un centro escolar y no convivían con hermanos menores de 5 años. Los resultados aparecen en la Tabla 23.

Número identificativo de sujeto excluido	Edad	Sexo	Acude a guardería o colegio/instituto	Hermanos menores de 5 años
11	8 años 0 meses	Mujer	Sí	0
12	5 años 2 meses	Mujer	Sí	0

Tabla 23: participantes con hallazgo de oxiuros en el estudio de heces.

La infección por *Enterobius vermiculares* (u oxiuros) es frecuente en nuestro medio. Afecta principalmente a niños entre 5 y 10 años y su transmisión es feco-oral y directa. En la mayoría de los casos es asintomática, pero puede provocar prurito anal/perianal, dolor abdominal en fosa iliaca derecha, alteración del tránsito intestinal, irritabilidad, alteración del sueño, bruxismo y, en niñas, prurito vulvar²⁴⁵. La prevalencia en niños europeos ha disminuido en los últimos años, de un 40-60% en 1947 hasta un 5-24% en los últimos años²⁴⁸. La prevalencia en nuestro trabajo probablemente se deba a la inclusión únicamente de sujetos asintomáticos.

Está indicado el tratamiento con Mebendazol en 2 dosis separadas 2 semanas. Las dos participantes en las que se obtuvo este hallazgo fueron tratadas por su pediatra. En ambos casos se solicitó una segunda muestra que no llegó a recibirse.

9.1.4 EXCLUIDOS POR HALLAZGO DE COPROCULTIVO POSITIVO

Se encontraron cultivos positivos para *Campylobacter spp.* en 3 participantes. Dos de ellos acudían a guardería o centro escolar y el tercero convivía con un hermano menor de 5 años. En los 3 casos se contactó con los familiares y se consiguió una segunda muestra que fue negativa, sin intervención del pediatra, y pudo incluirse en el estudio (Tabla 24).

Número identificativo de sujeto excluido	Edad	Sexo	Acude a guardería o colegio/instituto	Hermanos menores de 5 años
4*	1 año 5 meses	Mujer	Sí	0
26*	2 años 7 meses	Hombre	No	1
31*	7 años 7 meses	Mujer	Sí	0

Tabla 24: participantes con hallazgo de *Campylobacter*. *Sujetos en los que se analizó una segunda muestra con hallazgo de flora intestinal normal.

La infección por *Campylobacter spp.* es la principal causa de gastroenteritis aguda bacteriana pediátrica en el mundo. Origina el 5-9% de los cuadros en nuestro medio²⁴⁹. La mayoría de las infecciones se producen por transmisión fecal-oral o partir de alimentos contaminados. Los síntomas suelen ser leves y autolimitados, y la mayoría de los autores recomiendan solo tratamiento de soporte con rehidratación si fuese preciso. En las formas con mayor afectación, o en pacientes con enfermedad de base o no inmunocompetentes puede estar indicado el tratamiento farmacológico²⁵⁰. En nuestra muestra, dos de los infectados asistían a un centro escolar, y el tercero convivía con un hermano menor de 5 años, lo que pudo facilitar la adquisición de la bacteria.

En 3 participantes se objetivó la presencia de *Salmonella spp.* en el coprocultivo. Se contactó con los padres de los 3 sujetos y se solicitó la entrega de una segunda muestra de heces que se recibió en uno de los casos. El coprocultivo de la misma fue negativo por lo que pudo incluirse en el estudio (Tabla 25).

Número identificativo de sujeto excluido	Edad	Sexo	Acude a guardería o colegio/instituto	Hermanos menores de 5 años
6	2 años 0 meses	Hombre	No	0
25	14 años 5 meses	Hombre	Sí	0
32*	12 años 3 meses	Mujer	Sí	0

Tabla 25: participantes con hallazgo de *Salmonella* en el estudio de heces. *Sujetos en los que se analizó una segunda muestra con hallazgo de flora intestinal normal.

Salmonella spp. es el patógeno más frecuentemente causante de toxiinfecciones alimentarias en países desarrollados. Se transmite por consumo de alimentos de origen animal contaminados, especialmente aves, huevo, ganado vacuno y cerdos. También persona a persona, especialmente en guarderías y hospitales. Algunos estudios describen una incidencia de hasta el 18% en niños asintomáticos que acuden a guarderías. Cuando produce gastroenteritis, suele durar 3-4 días aunque puede dar gran afectación general. La indicación de tratamiento varía en función de la clínica. El estado de portador asintomático se da con una frecuencia del 0.2 al 0.6% y suele ser resistente a la antibioterapia^{249,251}.

En el paciente de nuestro estudio en el que se repitió el análisis, pudo comprobarse la negativización del coprocultivo. Los otros 2 participantes seguían asintomáticos cuando se contactó con ellos por vía telefónica, tratándose probablemente de infección agudas subclínicas autolimitadas o de portadores asintomáticos.

9.1.5 EXCLUIDOS POR HALLAZGO DE ADENOVIRUS Y/O ROTAVIRUS

Tal y como se ha comentado previamente, el estudio de adenovirus y rotavirus en heces solo se llevó a cabo en los menores de 5 años. Se detectó adenovirus en una participante y adenovirus y rotavirus en otra. Ninguna de ellas acudía a guardería o centro escolar ni convivían con hermanos menores de 5 años. En ambos casos se contactó con los padres y se analizó una segunda muestra con resultado negativo, y fueron incluidas en el estudio (Tabla 26).

Número identificativo de sujeto excluido	Edad	Sexo	Acude a guardería o colegio/instituto	Hermanos menores de 5 años
2 (adenovirus)*	4 meses 5 días	Mujer	No	0
5 (adenovirus y rotavirus)*	13 días	Mujer	No	0

Tabla 26: participantes con hallazgo de adenovirus y/o rotavirus en el estudio de heces.

*Participantes en los que se analizó una segunda muestra con hallazgo de flora intestinal normal.

Los virus son los principales causantes de la GEA infecciosa en niños. Entre ellos, los rotavirus son los agentes etiológicos más importantes produciendo, en ocasiones GEAs con deshidratación secundaria en menores de 5 años. Los adenovirus representan el segundo agente viral más común. Se transmiten por vía fecal-oral y de persona a persona. El cuadro que originan suele ser autolimitado, requiriendo solo tratamiento de soporte. En ocasiones cursa de forma asintomática, lo que facilita su transmisión en este grupo poblacional²⁶¹.

En nuestro estudio, una recién nacida de 13 días de vida, presentó simultáneamente adenovirus y rotavirus en la muestra de heces. Otra participante, con hallazgo de adenovirus, tenía una edad de 4 meses. Se mantuvieron en todo momento asintomáticas, y el segundo análisis fue en ambos casos negativo.

9.1.6 EXCLUIDOS POR LA PRESENCIA DE SÍNTOMAS

En cuanto a los 3 participantes con síntomas en los 30 días previos al estudio, estos fueron referidos por los padres en la llamada telefónica realizada por el hallazgo de un valor de CF superior a 50 µg/g de heces. Se solicitó la entrega de una segunda muestra cuando completasen un periodo de 30 días asintomáticos, pero esta no fue proporcionada en ninguno de los casos (Tabla 27).

Número identificativo de sujeto excluido	Edad	Sexo	Síntomas
8	10 años 7 meses	Hombre	Dolor abdominal
19	5 años 9 meses	Hombre	Vómitos
37	28 días	Hombre	Cólico del lactante

Tabla 27: participantes excluidos del estudio por presencia de síntomas.

9.1.7 EXCLUIDOS POR LA INGESTA DE FÁRMACOS


Se contactó con 4 de los 9 excluidos por la toma de medicación en los 15 días previos a la recogida de la muestra. Solo se recibió la muestra de uno de ellos una vez transcurridos 15 días sin medicación, que pudo incluirse en el estudio.


Número identificativo de sujeto excluido	Edad	Sexo	Fármaco recibido
15	1 año 3 días	Hombre	Amoxicilina
16*	3 años 1 mes	Hombre	Ibuprofeno
17	4 años 5 días	Mujer	Ibuprofeno
18	13 años 10 meses	Hombre	Estilsona
23	6 meses 3 días	Mujer	Omeprazol
36	2 años 1 mes	Mujer	Ibuprofeno
41	3 años 8 meses	Mujer	Ibuprofeno
42	9 meses 26 días	Mujer	Valganciclovir
43	6 meses 22 días	Hombre	Ibuprofeno y antibiótico (no precisan)

Tabla 28: participantes excluidos del estudio por toma de fármacos. *Sujetos en los que se analizó una segunda muestra con hallazgo de flora intestinal normal.

9.2 APROBACIÓN DE COMITÉS DE ÉTICA

- Comité de ética e investigaciones clínicas GAE Niño Jesús, en noviembre de 2014, con código interno R-0063/14:

 **Hospital Infantil Universitario Niño Jesús**
SaludMadrid

 **Comunidad de Madrid**

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. ^a Julia Asensio Antón, Presidenta del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del investigador principal, para que se realice el proyecto de investigación, código interno: **R-0063/14**, Protocolo, versión 2 de 13/11/2014; Hoja de Información para pacientes mayores de 12 años, versión 2 de 13/11/2014; Hoja de información para padres o representantes legales, versión 2 de 13/11/2014; Formulario de recogida de datos, versión 2 de 13/11/2014, titulado: **"DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES NORMALES DE CALPROTECTINA Y LACTOFERRINA FECALES EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA SANA"**, y considera que:

El proyecto de investigación se plantea siguiendo los requisitos del Real Decreto 1344/2007 de 11 de octubre, la Orden SAS/3470/2009 de 16 de diciembre, y las normas que lo desarrollan, y su realización es pertinente.


Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.

El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para los sujetos y el plan de reclutamiento de sujetos previstos, son adecuados, así como las compensaciones previstas para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el proyecto de investigación.

La capacidad del investigador y sus colaboradores y las instalaciones y medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Por tanto, este Comité acepta que dicho proyecto de investigación sea realizado en el centro Hospital Infantil Universitario Niño Jesús por la Dra. Marta Velasco Rodríguez-Belvis, R-3 2014/2015 de Pediatría y sus AA.EE., y la Dra. M^a Carmen Plata Fernández, R-2 2014/2015 de Análisis Clínicos, como investigadoras principales.

Lo que firmo en Madrid a 25 de noviembre de 2014.


Fdo.: Julia Asensio Antón


N.I.F. 02870002


Avda. Menéndez Pelayo, 65
28009 MADRID
Teléfono: 91 503 69 00
Fax: 91 574 46 69

P.N.T. 16.041
14ª versión 25.11.2013

Mod. 000941

- Comisión Central de Investigación del Servicio Madrileño de Salud (Gerencia de Atención Primaria), en marzo de 2015, con código de protocolo 05/15:

 **Servicio Madrileño de Salud**
Gerencia de Atención Primaria
SaludMadrid Gerencia Adjunta de Planificación y Calidad

 Comunidad de Madrid

Informe de la Comisión Central de Investigación

Código de Protocolo: 05/15.

Título: Determinación de los niveles normales de calprotectina y lactoferrina fecales en población pediátrica sana.

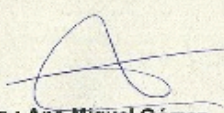
Version: v. 3
Fecha de protocolo: 09/03/2015


Investigador Principal: Marta Velasco Rodríguez-Belvis (MIR Pediatría) y Maria del Carmen Plata Fernández (FIR Análisis clínicos).
Promotor: Hospital Infantil Universitario Niño Jesús.

La **Comisión Central de Investigación**, en su reunión del miércoles 18 de marzo de 2015, según consta en el Acta 03/15, **INFORMA FAVORABLEMENTE** sobre la realización de dicho estudio en atención primaria de la Comunidad de Madrid.

Madrid, 26 de Marzo de 2015

Presidente de la Comisión Central de Investigación


Fdo.: Ana Miquel Gómez



9.3 DOCUMENTACIÓN COMPLEMENTARIA DEL ESTUDIO

- Hoja de información para padres o tutores:

+ Determinación de los niveles normales de calprotectina fecal en población pediátrica sana

Información para participar en el estudio (modelo para padres o representantes legales)

INTRODUCCIÓN

Un grupo de médicos de la Sección de Gastroenterología y Nutrición y el Servicio de Laboratorio del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús estamos realizando un estudio para determinar los niveles de normalidad de Calprotectina Fecal (CF) en niños sanos. La CF es una proteína que se encuentra en las heces que, en caso de enfermedad intestinal, se eleva hasta alcanzar cifras muy altas. Sin embargo, se desconocen los valores normales para niños que no tengan ninguna de estas enfermedades. La realización de este estudio y otros similares ayudará a pediatras de atención primaria y especialistas en gastroenterología infantil a decidir qué pacientes pueden tener una enfermedad intestinal y necesitan por tanto la realización de más pruebas. Para este estudio estamos solicitando a niños sanos como su hijo/a permiso para obtener una muestra de heces, en la que se estudiará el valor de CF. Además, en la muestra de su hijo se analizarán la presencia de rotavirus y adenovirus (en caso de ser menor de 5 años), así como un coprocultivos (para detectar la presencia de bacterias) y determinación de parásitos. Esta determinación tiene como fin excluir la posible presencia de alguna de estas infecciones.

Los datos personales de su hijo no aparecerán en las publicaciones que se deriven de este trabajo. Los resultados de los análisis estarán a disposición de su pediatra, quien podrá facilitártelos si usted así lo solicita.

RIESGOS Y BENEFICIOS ASOCIADOS AL ESTUDIO.

- 1.- *Riesgos de la toma de muestra.* No hay riesgo pues se trata de una prueba no cruenta. Sólo ha de recogerse una pequeña cantidad de una deposición realizada.
- 2.- *Beneficios para el enfermo:* No anticipamos ningún beneficio directo para su hijo/a.
- 3.- *Beneficios para la sociedad:* Esperamos que los resultados de este estudio nos permitan entender mejor la función de la CF, y en el futuro nos ayude a tomar las decisiones más correctas en el tratamiento de nuestros pacientes.

RECOGIDA DE LA MUESTRA.

Su pediatra le entregará un bote de recogida de heces para que recoja la muestra. Una pequeña cantidad de heces será suficiente. Una vez recogida, ha de ser refrigerada en una nevera doméstica, hasta su entrega. Rogamos la entregue en su Centro de Salud, junto con este documento firmado, en las 24 horas siguientes a su recogida. Los días de entrega serán el

HI (padres o tutores). Versión 2. 13/11/2014 | 1

lunes, martes y miércoles de cada semana. Allí será almacenado por su pediatra. Posteriormente, llevaremos la muestra al laboratorio del Hospital Infantil Niño Jesús donde será analizada.

INFORMACION ADICIONAL.

1.- Se garantiza la confidencialidad, tanto de la recogida de muestras como en la obtención de los resultados, según la legislación sobre protección de datos vigente en España (Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, 15/1999). Ningún participante en el estudio será identificado a la hora de comunicar los resultados en publicaciones o reuniones científicas. La obtención y manipulación de la muestra se realizará de acuerdo a la Ley de Investigación Biomédica (14/2007).

2.- La participación es completamente voluntaria. Si no quiere participar no tiene por qué dar explicaciones. Si decide retirarse del estudio, los datos no serán utilizados para el análisis final. En ese caso, las muestras que existiesen serán destruidas. No existe compensación económica por participar en el estudio.

3.- Será convenientemente informado sobre cualquier novedad que pueda influir en su interés por continuar en el estudio. Si tuviese algún problema o duda debe contactar con:

Sección de Gastroenterología y Nutrición
(A la atención de Marta Velasco Rodríguez-Belvis)
Hospital Infantil Universitario Niño Jesús
Calle Menéndez Pelayo nº 65
28009 Madrid

Correo electrónico de contacto: marta.velasco@salud.madrid.org
Número de teléfono de contacto: 915 03 59 00, extensión 7782 en horario de 8-15 horas
(busca del Servicio de Gastroenterología, ha de contactar con la Dra. Muñoz Codoceo o el Dr. Viada Bris)

4.- Su pediatra dispondrá de los resultados del análisis de la muestra de heces de su hijo en un plazo de 4 semanas desde la entrega de la misma, por lo que podrá consultarlo en su Centro de Salud a partir de ese momento. En caso de que encontremos un nivel de CF superior a 50 mg/g, o alguna otra alteración de las determinaciones realizadas (adenovirus, rotavirus, coprocultivo o parásitos), uno de los médicos encargados del estudio (Dra. Velasco o Dra. Muñoz Codoceo) contactará con usted, le explicará el significado de la muestra alterada y se repetirá la determinación. Si el valor obtenido en la segunda muestra siguiera estando elevado, el médico responsable valorará la necesidad de realizar otras pruebas complementarias.

5.- Le sugerimos que conserve una copia de este documento.

- Hoja de información para sujetos mayores de 12 años:

+ Determinación de los niveles normales de calprotectina fecal en población pediátrica sana



Información para participar en el estudio (pacientes mayores de 12 años)

INTRODUCCIÓN:

Un grupo de médicos que trabajamos en la Sección de Gastroenterología y Nutrición y el Servicio de Laboratorio del Hospital Niño Jesús estamos haciendo un trabajo para saber cuál es el nivel normal de Calprotectina Fecal en niños sanos.

Cuando el médico piensa que un niño o adolescente tiene una enfermedad intestinal, puede mandar una muestra de sus heces al laboratorio. Allí, se analizan los niveles de una proteína que se encuentra en las heces que, en caso de enfermedad intestinal, se eleva hasta alcanzar cifras muy altas. Si son muy altos, es más probable que tenga una enfermedad, y puede que necesite más pruebas para encontrar qué es lo que le pasa y así poder ayudarle a estar bien de nuevo.

El problema es que no se sabe cuáles son los niveles de esta proteína en niños sanos, y ese es el objetivo de este trabajo. Para eso, os pedimos a niños y adolescentes sanos como tú que participéis en él. Sólo tenéis que darnos permiso para recoger una muestra de vuestras heces y analizarla en el laboratorio. Además de los niveles de CF, en la muestra se realizará un coprocultivo (para detectar la presencia de bacterias) y determinación de parásitos, para comprobar que no tienes ninguna de estas infecciones.

Tus datos personales no aparecerán en las publicaciones que se deriven de este trabajo. Los resultados de los análisis estarán a disposición de tu pediatra por si quieres consultarlos.

RIESGOS Y BENEFICIOS ASOCIADOS AL ESTUDIO:

1.- *Riesgos de la toma de muestra.* No hay ningún riesgo para ti, ya que simplemente hay que recoger una pequeña cantidad de tus heces.

2.- *Beneficios para el enfermo:* No anticipamos ningún beneficio directo para su ti.

3.- *Beneficios para la sociedad:* Esperamos que los resultados de este estudio nos permitan entender mejor la función de la calprotectina fecal, y en el futuro nos sirva para ayudar a otros niños o adolescentes que estén enfermos.

RECOGIDA DE LA MUESTRA.

Tu pediatra te entregará un bote de recogida de heces para que recojas la muestra. Una pequeña cantidad de heces será suficiente. Una vez recogida, hay que guardarla en una nevera en casa, hasta que la entregues. Te pedimos que la lleves a tu Centro de Salud, con este documento firmado, en las 24 horas siguientes a su recogida. Los días de entrega serán el lunes, martes y miércoles de cada semana. Allí será almacenado por tu pediatra. Posteriormente, llevaremos la muestra al laboratorio del Hospital Infantil Niño Jesús donde lo analizaremos.

HI (pacientes mayores de 12 años). Versión 2. 13/11/2014 | 1

INFORMACION ADICIONAL.

1.- Se garantiza la confidencialidad, tanto de la recogida de muestras como en la obtención de los resultados, según la ley de protección de datos en España (Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, 15/1999). Esto significa que no serás identificado a la hora de comunicar los resultados en publicaciones o reuniones científicas. La obtención y manipulación de la muestra se realizará de acuerdo a la Ley de Investigación Biomédica (14/2007). Esto significa que no se usarán tus muestras para otra cosa diferente a lo propuesto en este estudio, y sólo las usarán los investigadores de este estudio.

2.- La participación es completamente voluntaria. Si no quieres participar no tienes por qué dar explicaciones. Si decides retirarte del estudio, los datos no serán utilizados para el análisis final. En ese caso, las muestras que existiesen serán destruidas. La no participación en el estudio no supondrá que recibas un tratamiento peor o diferente en ningún caso. No existe compensación económica por participar en el estudio.

3.- Serás convenientemente informado sobre cualquier novedad que pueda influir en tu interés por continuar en el estudio. Si tuvieses algún problema o duda debes contactar con:

Servicio de Gastroenterología y Nutrición
(A la atención de Marta Velasco Rodríguez-Belvis)
Hospital Infantil Universitario Niño Jesús
Calle Menéndez Pelayo nº 65
28009 Madrid

Correo electrónico de contacto: marta.velasco@salud.madrid.org
Número de teléfono de contacto: 915 03 59 00, extensión 7782 en horario de 8-15 horas
(busca del Servicio de Gastroenterología, ha de contactar con la Dra. Muñoz Codoceo o el Dr. Viada Bris)

4.- Tu pediatra dispondrá de los resultados del análisis de la muestra en un plazo de 4 semanas desde que se las entregues, por lo que podrás consultarlo en tu Centro de Salud a partir de ese momento. En caso de que encontremos un nivel de calprotectina fecal superior a 50 mg/g, o algún otro dato positivo (coprocultivo o parásitos) contactaremos contigo desde la unidad de Gastroenterología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Un médico del estudio (Dra. Velasco o Dra. Muñoz Codoceo) os explicará a tus padres y a ti el significado de la misma y te pedirá de nuevo una muestra de heces para repetir el nivel de calprotectina fecal. Si el valor de la segunda muestra siguiera estando elevado, el médico te explicará si es necesario que acudas de nuevo a la consulta.

5.- Te sugerimos que guardes una copia de este documento.

- Consentimiento informado para padres o tutores:

+ Determinación de los niveles normales de calprotectina fecal en población pediátrica sana



Número identificativo del paciente/ Iniciales pediatra	Consentimiento para participar en el estudio (pacientes mayores de 12 años)
--	--

He leído la información sobre este estudio. He podido preguntar a mi pediatra todas mis dudas, y me ha explicado todo de forma muy clara. Por lo tanto doy mi consentimiento para participar en el mismo.

Nombre y firma del paciente D.N.I. Fecha de la firma

Nombre y firma del médico responsable D.N.I. Fecha de la firma

Apartado para la revocación del consentimiento:

Yo..... revoco el consentimiento de mi participación en el estudio arriba indicado con fecha

Nombre y firma del padre/madre/tutor D.N.I. Fecha de la firma

- Consentimiento informado para mayores de 12 años.

+ Determinación de los niveles normales de calprotectina fecal en población pediátrica sana



Número identificativo del paciente/ Iniciales pediatra	Consentimiento para participar en el estudio (pacientes mayores de 12 años)
--	--

He leído la información sobre este estudio. He podido preguntar a mi pediatra todas mis dudas, y me ha explicado todo de forma muy clara. Por lo tanto doy mi consentimiento para participar en el mismo.

Nombre y firma del paciente D.N.I. Fecha de la firma

Nombre y firma del médico responsable D.N.I. Fecha de la firma

Apartado para la revocación del consentimiento:

Yo..... revoco el consentimiento de mi participación en el estudio arriba indicado con fecha

Nombre y firma del padre/madre/tutor D.N.I. Fecha de la firma

9.4 COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

9.4.1 PUBLICACIONES

- Velasco Rodríguez-Belvis M, Plata Fernández C, Viada Bris JF, García Salido A, Asensio Antón J, Muñoz Codoceo RA. Levels of fecal calprotectin in healthy children (0 to 18 years). The importance of age. IberoAmerican Journal Plus (IBJ Plus). Special Issue: 1st PhD Research Symposium in Health Sciences and Biomedicine. 2018;1-2:12. Disponible en: [http://ibjournals.com/IBJ-Plus/articles/2018/v1/s2/high/specialissue-2-IBJPlus-2018-1\(1\)e0001-e00127.pdf](http://ibjournals.com/IBJ-Plus/articles/2018/v1/s2/high/specialissue-2-IBJPlus-2018-1(1)e0001-e00127.pdf)



PhD Programme in Medicine and Surgery

MED 09

Levels of fecal calprotectin in healthy children (0 to 18 years). The importance of age.

Marta Velasco Rodríguez-Belvis^{1*}, Carmen Plata Fernández², Javier Francisco Viada Bris³, Alberto García Salido⁴, Julia Asensio Antón⁵, Rosa Ana Muñoz Codoceo⁶.

¹Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain.

*Corresponding author:

Marta Velasco Rodríguez-Belvis, ¹Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain. E-mail: mvelasco@salud.madrid.org

Introduction: Calprotectin is a calcium binding protein of neutrophil granulocytes that correlates strongly with neutrophil infiltration of the intestinal mucosa when measured in faeces. However, fecal calprotectin (FC) is a non-specific inflammation marker and can be potentially influenced by factors like diet and age. In fact, previous studies report that children tend to have higher FC levels than adults. However, only a few trials have been specifically designed to establish the normal FC levels in healthy children, and in each case analyzed small and/or heterogeneous samples. Our primary aims in this study were to (i) establish normal levels of FC in healthy children living in a modern Spanish urban environment; and (ii) analyze their correlation with age.

Material and methods: A multicenter, cross-sectional and observational study was conducted between January 2015 and December 2016. We enrolled healthy voluntary donors from 0 to 18 years of age who attended one of the four participating primary health centers for routine growth monitoring or vaccination. The exclusion criteria were: (i) immunodeficiency; (ii) gastrointestinal or autoimmune disease; (iii) intake of drugs or gastrointestinal symptoms in the previous 15 or 30 days respectively; or (iv) positive finding in the accompanying microbiological study. We determined the FC levels using the Quantum Blue® Calprotectin test, and we performed stool cultures, including parasites, rotavirus and adenovirus detection. All data was analysed using SPSS® version 20.

Age group	No. of Subjects	Mean FC (µg/g)	10thP (µg/g)	50thP (µg/g) (median)	90thP (µg/g)
< 1 month	43	344,3	156	303	620
1-6 months	64	424	76	325,5	993
6-12 months	46	167,7	30	63	488
12-24 months	42	217,7	30	97	533
2-4 years	45	116,1	30	71	271
4-8 years	64	89,1	30	46	163
8-12 years	46	85,4	30	34,5	143
12-18 years	45	45,2	30	30	75
Total (0-18 years)	395	191,6	30	77	508,4

Table 1: FC levels in each age group. FC: fecal calprotectin. 10thP: 10th percentile. 50thP: 50th percentile. 90thP: 90th percentile.

Results: We included 395 subjects from 3 days to 16.9 years old (mean 4.2 years, SD 4.7 years), distributed in 8 age groups. Among them, 204 were boys (51.6%) and 191 were girls (48.4%). The FC levels in each age group are shown table 1. The FC values did not show a normal distribution, with higher figures in children under six months old. The correlation between age (days) and FC (µg/g) was analyzed using the Spearman correlation coefficient, with a bilateral significance of 0.00.

Conclusions: normal FC values in healthy children were higher than those considered as pathological in adults. This was particularly the case in children under four years old, and especially in those under 12 months. A negative correlation with age was observed. Based on this, it seems necessary to reconsider the levels of FC considered pathological in pediatric patients by age group.

Keywords: fecal calprotectin, children, healthy.

Published May 18, 2018.

Copyright: © 2018 Authors. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Editor: Name of the editor here.

Cite as: Marta Velasco Rodríguez-Belvis, Carmen Plata Fernández, Javier Francisco Viada Bris, Alberto García Salido, Julia Asensio Antón, Rosa Ana Muñoz Codoceo. Levels of fecal calprotectin in healthy children (0 to 18 years). The importance of age. IBJ Plus 2018 (52):e00058 doi: 10.24217/2531-0151.18v1s2.00058.

Funding: Fundación de Investigación Biomédica del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús

Competing Interests: All authors have declared no conflicts of interest.



www.ibjournals.com

12

2018 | Volume 1 | S. Issue 2 | e000058

- Velasco Rodríguez-Belvis M, Viada Bris JF, Plata Fernández C, García Salido A, Asensio Antón J, Palomino Pérez L, Muñoz Codoceo, RA. Faecal calprotectin in healthy children. Journal of Crohn's and Colitis. 2019;13(Supp 1):193-194. Disponible en: https://academic.oup.com/ecco-jcc/issue/13/Supplement_1?browseBy=volume

/ none					
Diarrhoea /	23 (88%) / 3	204 / 228	82 / 124	NS	
none					
Cholest.	11 (48%) / 12	203 / 204	82 / 84	NS	
treated / no					
Successful	6 (54%) / 5	250 / 146	66 / 69	0.03	
treatment / no					

*Validation range 5–300 ng/ml; †p-value compares each line; NS = non-significant ($p > 0.05$)

A value of 7αC4 in the serum higher than 48 ng/ml had a positive predictive value of more than 80% for treatment success of the

P201

Faecal calprotectin in healthy children: are there factors affecting levels other than age?

M. Velasco Rodríguez-Belvis^{1,2}, J. F. Viada Bris¹, C. Plata Fernández², A. García Salido³, J. Asensio Antón², L. Palomino Pérez², R. A. Muñoz Codoceo³
¹Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Gastroenterology and Nutrition, Madrid, Spain, ²Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Clinical Analysis Department, Madrid, Spain, ³Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Pediatric Intensive Care Unit, Madrid, Spain

S194

Poster presentations

Background: Our aims were to (i) establish normal levels of faecal calprotectin (FC) in healthy children and (ii) analyse the correlation with age, gender, anthropometry, perinatal data, and the type of feeding.

Methods: Multi-centre, cross-sectional, and observational study including healthy children who attended the routine follow-up visits from the Healthy Child Program. Exclusion criteria: (i) immunodeficiency; (ii) autoimmunity; (iii) gastrointestinal disease; (iv) intake of drugs; (v) gastrointestinal symptoms; or (vi) any positive finding in the associated microbiological study. We determined FC levels (Quantum Blue® test) and performed stool cultures, parasites, rotavirus, and adenovirus detection. The statistical analysis (SPSS® software) considered a p -value of <0.05 statistically significant.

Results: We included 395 subjects (3 days to 16.9 years old); 51.6% boys (mean FC 196.8, median 86.0 µg/g) and 48.4% girls (mean FC 186.0, median 71.0 µg/g), with no significant differences (Mann-Whitney U test $p > 0.05$). FC values showed a non-normal distribution, with higher values in young participants (see table). A negative correlation trend was found between age and FC (Spearman's $\rho = -0.603$, $p < 0.05$), as shown in the image. Weight was recorded in 389 subjects (mean 17.9 kg, 95% CI 16.4–19.6). Height was recorded in 383 children (mean 94.2 cm, 95% CI 90.4–98). BMI was calculated in 382 subjects (mean 16.4 kg/m², 95% CI 16.1–16.6). The multi-variate analysis with age as the control variable showed no correlation with weight or BMI but revealed an inverse correlation between height and FC. We found no significant differences between the type of birth and FC (Mann-Whitney U test $p > 0.05$) and no correlation with gestational age or birth weight (Spearman's test $p > 0.05$). Type of diet (breastfeeding, bottle feeding, or mixed feeding) in subjects under 6 months of age showed no correlation with FC (Kruskal-Wallis $p > 0.05$).

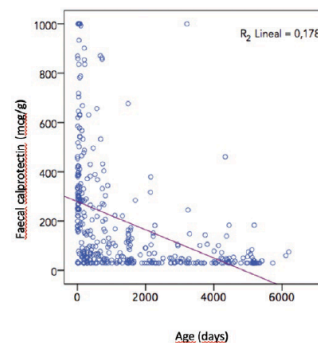
Conclusions: (i) FC values in healthy children were higher than those considered as pathological in adults. (ii) A negative correlation with age and height was observed. (iii) No correlation with gender, type of birth, gestational age, birth weight, or type of feeding in the first 6 months was found. (iv) It seems necessary to reconsider the levels of FC deemed pathological in paediatric patients by age group and further analyse the role of other factors.

P202

Quantum blue anti-infliximab: development and evaluation of a point of care rapid test for measuring anti-infliximab antibodies in human serum

F. Bantleon¹, M. Schneider^{1,2}, B. Ricken¹, S. Velayutham¹, D. Trapani¹, J. Afonso², F. Magro², A. Abel¹
¹BUHLMANN Laboratories AG, Schönenbuch, Switzerland, ²Faculty of Medicine, University of Porto, Department of Biomedicine, Unit of Pharmacology and Therapeutics, Porto, Portugal

Background: The treatment of patients suffering from an inflammatory disease, like inflammatory bowel disease (IBD) may involve biologicals like infliximab. However, infliximab is a chimeric human/murine monoclonal antibody and can induce a significant immune response. Within this immune response different anti-infliximab antibodies are formed, belonging to different isotypes (eg. IgM, IgG₁, IgG₂, and IgE) with different specificities and affinities. The detection of these anti-infliximab antibodies is crucial to adjust the therapy with infliximab or to justify a switch of the used drug. For the fast and easy detection of the anti-infliximab response a lateral flow test was developed and preliminary evaluated.



Abstract P201 Figure. scatterplot showing the relationship between age and FC.

Abstract P201

Age group	Number of subjects	Mean FC (µg/g)	10thP (µg/g)	50thP (µg/g)	90thP (µg/g)
< 1 month	43	344.3	156	303	620
1–3 months	64	424	76	325.5	993
6–11 months	46	167.7	30	63	488
12–23 months	42	217.7	30	97	533
2–3 years	45	116.1	30	71	271
4–7 years	64	89.1	30	46	163
8–11 years	46	85.4	30	34.5	143
12–18 years	45	45.2	30	30	75
Total (0–18 years)	395	191.6	30	77	508.4

FC levels in each age group. 10thP: 10th percentile. 50thP: 50th percentile. 90thP: 90th percentile.

- Velasco Rodríguez-Belvis M, Viada Bris JF, Plata Fernández C, García Salido A, Asensio Antón J, Palomino Pérez LM, Domínguez Ortega G, Cañedo Villarroya E, Pedrón Giner C, Rodríguez Manchón S, Bacelo Ruano I, Martínez Ibeas MA, Martín Peinador Y, Leal de Pedro E, Martínez Pérez J, Muñoz Codoceo RA. Faecal calprotectin in healthy children: are there factors affecting levels other than age? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2019;68(Supp1):372-373. Disponible en: <https://journals.lww.com/jpgn/toc/2019/05001>



GASTROENTEROLOGY - Gastroenterology other

G-P-231

Faecal calprotectin in healthy children: are there factors affecting levels other than age?

Marta Velasco Rodríguez-Belvis¹, Javier Francisco Viada Bris¹, Carmen Plata Fernández², Alberto García Salido³, Julia Asensio Antón², Laura Palomino Pérez¹, Gloria Domínguez Ortega¹, Elvira Cañedo Villarroya¹, Consuelo Pedrón Giner¹, Silvia Rodríguez Manchón¹, Irene Bacelo Ruano¹, María Ángeles Martínez Ibeas¹, Yolanda Martín Peinador⁴, Eva Leal de Pedro⁴, Jorge Martínez Pérez¹, Rosa Ana Muñoz Codoceo¹

¹Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Gastroenterology and Nutrition, Madrid, Spain

²Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Clinical Analysis Department, Madrid, Spain

³Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Intensive Care Unit, Madrid, Spain

⁴Centro de Salud Goya, Pediatrics, Madrid, Spain

Objectives: Our aims were to (i) establish normal levels of faecal calprotectin (FC) in healthy children from a Spanish urban environment and (ii) analyse the correlation of FC with age, gender, anthropometry, perinatal data and the type of feeding.

Methods: Multicentre, cross-sectional and observational study including healthy donors under 18 who attended the routine follow-up visits from the Healthy Child Program.

Exclusion criteria: (i) immunodeficiency; (ii) autoimmunity; (iii) gastrointestinal disease; (iv) intake of drugs; (v) gastrointestinal symptoms; or (vi) any positive finding in the associated microbiological study.

We determined FC levels (Quantum Blue® test) and performed stool cultures, parasites, rotavirus, and adenovirus detection. The statistical analysis (SPSS® software) considered a P value < 0.05 statistically significant.

Results: We included 395 subjects (3 days to 16.9 years old); 51.6% boys (mean FC 196.8, median 86.0 µg/g) and 48.4% girls (mean FC 186.0, median 71.0 µg/g), with no significant differences (MannWhitney U test p > 0.05).

FC values showed a non-normal distribution, with higher values in young participants (see table 1). A negative correlation trend was found between age and FC (Spearman's rho = 0.603, p < 0.05).

Weight was recorded in 389 subjects (mean 17.9 Kg, 95% CI 16.4-19.6). Height was recorded in 383 children (mean 94.2 cm, 95% CI 90.4-98). BMI was calculated in 382 subjects (mean 16.4 Kg/m², 95% CI 16.1-16.6). Weight, height and BMI showed a negative correlation with FC (Spearman test, significance level p < 0.05). However, the multivariate analysis with age as the control variable showed no correlation with weight or BMI but revealed an inverse correlation between height and FC, as shown in table 2.

We found no significant differences between the type of birth and FC (MannWhitney U test p > 0.05)

and no correlation with gestational age or birth weight (Spearman's test p > 0.05). Type of diet

(breastfeeding, bottle feeding or mixed feeding) in subjects under 6 months of age showed no

correlation with FC (KruskalWallis p > 0.05).

Conclusions: (I) FC values in healthy children were higher than those considered as pathological in adults. A negative correlation with age and height was observed.

(II) No correlation with gender, type of birth, gestational age, birth weight or type of feeding in the first 6 months was found.

(III) Our results suggest that weight and BMI do not influence FC values, since the negative correlations with their absolute values were not confirmed with the multivariate analysis. This may reflect the role of age as a confounding factor. We found a negative correlation between height and FC, that had not been previously described.

(IV) Based on this, it seems necessary to reconsider the levels of FC deemed pathological in pediatric patients by age group and further analyse the role of other factors.

- Velasco Rodríguez-Belvis M, Viada Bris JF, Plata Fernández C, García Salido A, Domínguez Ortega G, Muñoz Codoceo RA. Normal fecal calprotectin levels in healthy children are higher than in adults and decrease with age. *Paediatrics & Child Health*. 2019;XX – XX:1-7. Disponible en; <https://academic.oup.com/pch/advance-article/doi/10.1093/pch/pxz070/5519510?guestAccessKey=f5635805-fe74-40e6-9428-8aec653f85f2>

Original Article

Normal fecal calprotectin levels in healthy children are higher than in adults and decrease with age

Marta Velasco Rodríguez-Belvis MD^{1,*}, Javier Francisco Viada Bris MD¹, Carmen Plata Fernández PD², Alberto García-Salido PhD³, Julia Asensio Antón MD², Gloria Domínguez Ortega PhD¹, Rosa Ana Muñoz Codoceo PhD¹

¹Gastroenterology and Nutrition Department, Hospital Infantil Universitario Nino Jesús, Madrid, Spain; ²Clinical Analysis Department, Hospital Infantil Universitario Nino Jesús, Madrid, Spain; and ³Pediatric Intensive Care Unit, Hospital Infantil Universitario Nino Jesús, Madrid, Spain

Correspondence: Marta Velasco Rodríguez-Belvis, Gastroenterology and Nutrition Department, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Avenida Menéndez Pelayo, 65. 28009, Madrid, Spain. Telephone +34-915-035-900, fax +34-915-035-911, e-mail martavrb@gmail.com

Abstract

Background/Objectives: The paediatric reference range of fecal calprotectin (FC) has not been decisively established and previous studies show a wide within-age variability, suggesting that other factors like anthropometric data or type of feeding can influence FC. Our aims were to establish the normal levels of FC in healthy children grouped by age and analyze whether sex, gestational age, birth weight, type of delivery, type of feeding, or anthropometric data influence FC values.

Methods: This multicentre, cross-sectional, and observational study enrolled healthy donors under 18 years of age who attended their Primary Health Care Centre for their routine Healthy Child Program visits. The exclusion criteria were: (i) immunodeficiency, (ii) autoimmune or (iii) gastrointestinal disease; (iv) medication usage; (v) gastrointestinal symptoms; or (vi) positive finding in the microbiological study.

Results: We enrolled 395 subjects, mean age was 4.2 years (range 3 days to 16.9 years), and 204 were male. The median FC was 77.0 mcg/g (interquartile range 246). A negative correlation between age and FC was observed (Spearman's rho = -0.603, $P < 0.01$), and none of the other factors analyzed were found to influence FC levels.

Conclusions: Normal FC values in healthy children (particularly in infants) are higher than those considered to be altered in adults and show a negative correlation with age. It is necessary to reconsider the upper limits of FC levels for paediatric patients according to age, with further studies required to determine other factors that influence FC during infancy.

Keywords: Children; Fecal calprotectin; Healthy.

Improved biomarkers for suspected paediatric inflammatory bowel disease (IBD) are a clinical need, since none of the currently available surrogate inflammatory markers are completely reliable (1). Calprotectin is a 36.5 kDa calcium binding protein that accounts for as much as 60% of the total protein in the cytosol of neutrophilic granulocytes and macrophages. When

bound to calcium, it is remarkably resistant to proteolytic enzymes and heat, and is stable in feces for 3 to 4 days at room temperature (2). Its fecal concentration correlates with neutrophil infiltration of the intestinal mucosa and disease activity in IBD and could theoretically be used as a noninvasive screening test for bowel inflammation in children (3–12).

Received: January 8, 2019; Accepted: May 2, 2019

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press on behalf of the Canadian Paediatric Society. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

However, fecal calprotectin (FC) is a nonspecific inflammation marker that also rises in other acute and chronic gastrointestinal disorders (13–15) and can additionally be influenced by factors such as drug intake, diet, weight, gestational age, type of delivery, and especially age (16–24). Previous studies report that children tend to have higher FC levels than adults (17,20,21,25–29), but the paediatric reference range has not been decisively established. Some of these studies analyzed small samples and/or were recruited from populations with socioeconomic disparities (21,25,26,30–32) and show a wide within-age variability. Our primary objective was to establish the normal levels of FC in a healthy population of children grouped by age. Our secondary aim was to analyze whether sex, anthropometric data, gestational age, birth weight, type of delivery, or type of feeding during the first months of life influence FC values.

MATERIALS AND METHODS

A multicentre, cross-sectional, and observational study was conducted for 2 years, from January 2015 to December 2016.

Children included

The samples were obtained from healthy voluntary donors from 0 to 18 years of age who attended one of the four participating Primary Health Care Centres located in Madrid (Spain) for the routine follow-up visits recommended in the Healthy Child Program of this region. The absolute exclusion criteria were: previous diagnosis of (i) immunodeficiency, (ii) autoimmune disease, or (iii) gastrointestinal diseases such as cystic fibrosis, celiac disease, inflammatory bowel disease, eosinophilic esophagitis and/or gastroenteritis, cow's milk protein allergy, allergic gastroenteropathy, or gastroesophageal reflux disease. The relative exclusion criteria were: (i) intake of immunomodulators, antibiotics, corticosteroids, proton pump inhibitors, probiotics, ibuprofen, or montelukast in the previous 15 days; (ii) gastrointestinal symptoms such as abdominal pain, diarrhea (defined as an increase in the number of daily stools or change in their consistency to types 6 to 7 of the Bristol scale), constipation, anal fissure or vomiting in the previous 30 days; or (iii) positive finding in the accompanying microbiological study. Those subjects meeting the relative exclusion criteria were allowed to participate in the study at a later date, 1 to 3 months after these conditions were resolved. To determine the effect of age on FC, the children were divided into eight age groups. For practical reasons, these groups were based on the routine follow-up visits recommended in the Healthy Child Program of this region: 0 to 1 month, 1 to 5 months, 6 to 11 months, 12 to 23 months, 2 to 3 years, 4 to 7 years, 8 to 11 years, and 12 to 18 years.

Those children fulfilling the mentioned criteria were enrolled after obtaining a written informed consent from the next of kin,

caretakers, or guardians on behalf of the children (Figure 1). We recorded demographic, perinatal, and anthropometric data. The dietary patterns were recorded in subjects under 6 months. This information was restricted to this age group due to the limited variation with only three options: exclusive breastfeeding, mixed feeding, and formula feeding. Once the sample was collected, it was stored in a domestic refrigerator (between 3 and 5°C) until its delivery within 24 hours to their primary health care centre. The samples were then brought to the Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (Clinical Analysis Department) and also stored in a refrigerator (4°C) for a 24 to 48 hours period before being processed.

Measurement of FC

The FC concentration was determined within 48 hours, after being homogenized, using a commercial enzyme linked immunoassay (Quantum Blue fCAL Extended test, BÜHLMANN Laboratories AG, Schönenbuch, Switzerland) with a sensitivity of <10 mcg/g FC in fecal sample and acceptable imprecision levels for both low and high values (coefficient of variation < 10% for intra-assay and <15% for interassay) (33). The results are expressed as mcg/g stool. The upper reference limit in healthy adults supplied by the manufacturer was 50 mcg/g stool (34). Stool culture, parasites, rotavirus, and adenovirus detection were performed. The two latter tests were only performed in those subjects under 5 years of age. If any of these tests yielded positive results, the patient was excluded from the study and both the family and the corresponding General Paediatrician were informed. Those participants whose FC concentrations were higher than 50 mcg/g received a follow-up call in the following weeks to ascertain the absence of symptoms or drug intake. Subjects reporting symptoms or drug intake were asked to deliver a second sample 1 to 3 months after these conditions were resolved.

Statistical analysis

The sample size was estimated for a reference population of 1,200,000 subjects under 18 years old in the Community of Madrid. A standard deviation (SD) of 140 mcg/g (29) with 95% confidence interval was expected. These SD had to be based on a narrower study, due to the scarce data available on this issue. The Epidat statistical software package 4.2, 2016 (Xunta de Galicia, Spain; Organización Panamericana de saúde OPS-OMS; Univerdidade CES, Colombia) estimated that 383 subjects were needed for a 14 mcg/g precision. The statistical analysis was performed using the SPSS statistical software package 20 (IBM). The quantitative variable 'CF level' (mcg/g) in both the total sample and each age group was described by median with interquartile range. The normality of the sample was analyzed via Kolmogorov-Smirnov test. Data followed a non-normal distribution, so nonparametric tests were used for the rest of the analysis. We used the Mann-Whitney,

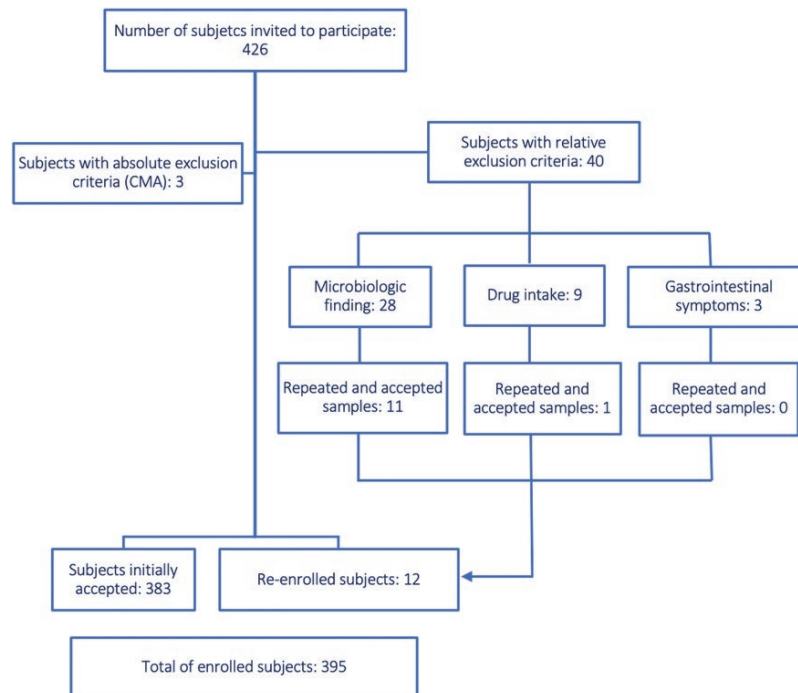


Figure 1. Diagram showing the number of enrolled patients. CMA Cow's milk allergy. Those subjects meeting the relative exclusion criteria were allowed to participate in the study at a later date, 1 to 3 months after these conditions were resolved. A total of 426 children were invited to participate; 43 potential subjects were excluded according to the described exclusion criteria. Of these, 12 subjects were re-enrolled. Ultimately, 395 healthy children were recruited for our study.

Kruskal–Wallis or Spearman's rho correlation tests as appropriate. All the tests were two-tailed, and statistical significance was set at $P < 0.05$.

The study was approved by the Ethics and Clinical Research Committee of Hospital Infantil Universitario Niño Jesús and the Central Research Commission of the Madrid Health Service and conducted in accordance with the revised Declaration of Helsinki. Prior written informed consent was obtained from the parents or legal guardians of all participants and from those volunteers that were 12 years and older.

RESULTS

A total of 426 children were invited to participate in our study. Ultimately, 395 healthy children were recruited, as shown in Figure 1.

Up to 239 participants had a FC level > 50 mcg/g (60.5%), which has been considered as the upper limit for adults. We were able to contact 219 of them (91.6%) for a telephonic follow-up, and none reported to be taking drugs or suffering from gastrointestinal symptoms or respiratory infections.

The median age was 2 years (IQR 6.5 years) with a range from 3 days to 16.9 years old. There were 204 boys (51.6%) and 191 girls (48.4%). The median FC was 77.0 mcg/g (IQR 246). The sample demographic and anthropometric data, and FC levels are shown in Table 1 and Figure 2.

FC Levels In Different Age Groups of Healthy Children

FC is higher than in adults and decreases with age

The FC values obtained did not show a normal distribution, with higher values in children under 6 months old. The FC concentrations showed a negative trend from newborns (median FC 303 mcg/g, interquartile range [IQR] 202) to 6 to 11 months of age (median FC 63 mcg/g, IQR 126) followed by an increase in the group aged 12 to 23 months (median FC 97 mcg/g, IQR 275), and a further decrease with age, as shown in Figure 2.

The correlation between age (days) and FC (mcg/g) was analyzed using the Spearman's rho test, which yielded a coefficient of -0.603 (95% confidence interval [CI] -0.662 to -0.536) with a bilateral significance ($P = 0.00$) and therefore suggested a negative linear relationship between both variables.

Table 1. Demographic and anthropometric data of each age group

Age group (number of subjects)	Boys:girls VD:CS Median GA in weeks (IQR)	Mean weight SD (95% CI) (number of subjects measured)	Mean height SD (95% CI) (number of subjects measured)	Mean BMI SD (95% CI) (number of subjects measured)	FC 50thP (µg/g) (IQR)
<1 month (43)	27:16 37:6 39 weeks (2) BF:MF:FF 33:5:5	-0.56 SD (-1.00 to -0.13) (43)	-0.35 SD (-0.67 to -0.03) (43)	-0.46 SD (-0.96 to 0.03) (43)	303 (202)
1–5 months (64)	35:29 51:13 39 weeks (2) BF:MF:FF 36:21:4	-0.39 SD (-0.69 to -0.09) (63)	-0.33 SD (-0.66 to -0.01) (62)	-0.26 SD (-0.54 to 0.01) (61)	325.5 (375)
6–11 months (46)	24:22 34:12 40 weeks (2)	-0.37 SD (-0.69 to -0.06) (46)	-0.31 SD (-0.68 to 0.05) (46)	-0.26 SD (-0.52 to 0.00) (46)	63 (126)
12–23 months (42)	22:20 29:13 39 weeks (2)	-0.52 SD (-0.84 to -0.20) (42)	-0.55 SD (-1.07 to -0.04) (41)	-0.23 SD (-0.55 to 0.08) (41)	97 (275)
2–3 years (45)	23:22 32:13 39 weeks (2)	-0.40 SD (-0.68 to -0.11) (41)	-0.46 SD (-0.85 to -0.07) (40)	-0.18 SD (-0.48 to 0.11) (39)	71 (130)
4–7 years (64)	33:31 41:22 39 weeks (3)	-0.18 SD (-0.48 to 0.12) (62)	-0.25 SD (-0.60 to 0.09) (61)	-0.12 SD (-0.41 to 0.17) (61)	46 (89)
8–11 years (46)	22:24 33:11 39.5 weeks (2)	-0.22 SD (-0.45 to 0.01) (46)	0.06 SD (-0.33 to 0.44) (44)	-0.23 SD (-0.44 to -0.03) (44)	34.5 (48)
12–18 years (45)	18:27 36:8 39 weeks (2)	-0.20 SD (-0.47 to 0.07) (45)	-0.03 SD (-0.37 to 0.32) (45)	-0.28 SD (-0.52 to -0.03) (45)	30 (19)
Total (0–18 years) (395)	204:191 293:98 39 weeks (2)	-0.35 SD (-0.45 to -0.24) (388)	-0.28 SD (-0.40 to -0.15) (382)	-0.25 SD (-0.35 to -0.14) (380)	77 (246)

BF Breast-fed; CI Confidence interval; CS Caesarean section; FC Fecal calprotectin; FF Formula-fed; GA Gestational age; IQR Interquartile range; MF Mixed-fed; 50thP 50th percentile (median); SD Standard deviation; VD Vaginal delivery.

Figure 3 shows the scatter plot in which this relationship is observed in those under 12 months of age.

Correlation between sex, type of birth, gestational age or feeding, and levels of FC

FC is not different between sexes or influenced by type of birth, gestational age or feeding

Regarding the correlation with sex, male subjects had a median FC of 86.0 mcg/g (IQR 251) and female participants showed a median FC of 71.0 mcg/g (IQR 223). There were no significant differences between sexes with a bilateral significance (Mann-Whitney test 18,785.5, $P=0.536$).

The type of birth and gestational age was recorded in 391 volunteers (99% of the total sample). A total of 293 subjects (74.9%) were born by vaginal delivery and 98 subjects (25.1%) were born by Caesarean section. There were 344 (88.0%) term births (between 37 and 41 + 6 weeks of gestation), 34 (8.7%) preterm births (<37 weeks), and 13 (3%) post-term births (>42 weeks). The mean gestational age was 38.7 weeks (95% CI of 38.4 to 39.0), with a median of 39 weeks. In the term birth group, median FC was 81.0 mcg/g (IQR 249). The birth weight was registered in 392 participants (99.2%). The mean was 3.2 kg (95% CI of 3.1 to 3.3 kg), and the median was 3.2 kg (minimum 750 gr, maximum 4.9 kg, range 4.2 kg).

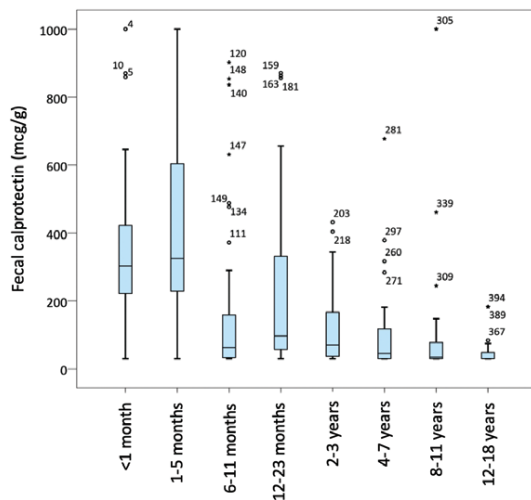


Figure 2. Box-and-whiskers plots showing fecal calprotectin (FC) values for each age group. The line in the middle of the boxes represents the median FC. The bottom and top of the box indicate the 25th and 75th percentile. The lower and upper whiskers show the least and greatest value excluding outliers. The points and stars represent outliers and extreme outliers.

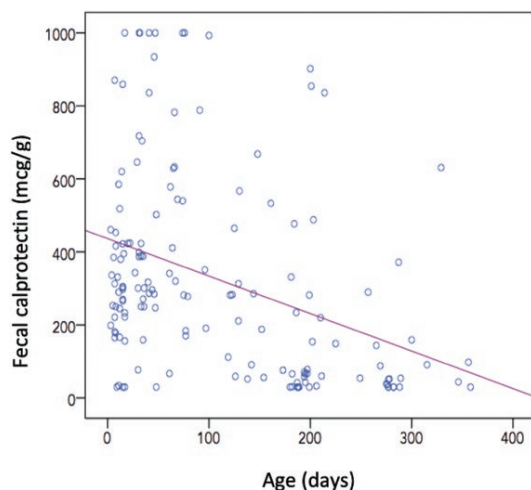


Figure 3. Scatter plot that show the negative linear relationship between age and fecal calprotectin levels in those subjects <12 months of age.

There was no correlation between the type of delivery (Mann–Whitney test 14,080.0, $P=0.773$), weeks of gestation (Spearman's rho test 0.016, $P=0.748$), or birth weight (Spearman's rho test 0.047, $P=0.356$) and FC values in the whole sample nor in the youngest subgroups of patients (<1 month and 1 to 5 months of age).

The type of feeding received at the time of enrolment was analyzed in the group of infants younger than 6 months ($N=107$

subjects). These data were collected in 104 subjects of the group (97.2%). A total of 69 infants (66.4%) received exclusive breastfeeding (median FC 343 mcg/g, IQR 392), nine infants (8.7%) received mixed feeding (median FC 331 mcg/g, IQR 261), and 26 (25%) were formula-fed infants (median FC 274 mcg/g, IQR 210). There were no statistically significant differences between the 3 groups (Kruskal–Wallis test 4.083, $P=0.130$).

Correlation between weight, height, and BMI and levels of FC

Weight and BMI did not show a correlation with FC levels. Height showed a negative correlation with FC

Weight, height, and body mass index (BMI) were recorded in 383, 389, and 382 volunteers respectively. The correlation of these absolute values with FC levels was analyzed using the Spearman's test. In all three cases, it showed a negative value with a bilateral significance ($P=0.000$), suggesting a negative correlation between each of the three variables and the FC. In order to determine the role of age as a possible confounding factor, we also analyzed the correlation between the sex and age-specific Z-scores for the anthropometric data. We found a negative correlation trend with no statistical significance between both weight SD (Spearman's test -0.067 , $P=0.190$) and BMI SD (Spearman's test -0.029 , $P=0.569$) and FC levels. Nevertheless, we found a negative correlation between height SD (Spearman's test -0.1 , $P=0.015$) and FC.

Finally, we performed a post-hoc multivariate analysis to further control the variable age. This analysis showed no correlation of weight and BMI with FC. However, it confirmed a negative correlation between height and FC.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study which describes the FC in a population of healthy children of all ages. We found higher FC concentrations than those considered as the upper reference in healthy adults (50 mcg/g) (17,34). This was particularly clear in healthy children under 1 month and from 1 to 6 months of age, whose mean FC values (303 mcg/g and 325.5 mcg/g, respectively) were higher to those described in IBD patients. In fact, a recent meta-analysis showed that FC values of 250 mcg/g could distinguish adult IBD patients in remission compared with active disease with a sensitivity and specificity of 80 and 82%, respectively (35). Although there is no ideal paediatric cut-off value to reflect mucosal inflammation and predict disease outcome in paediatric IBD patients, 250 mcg/g has also been suggested in the evidence-based guidelines (36). Interestingly, our FC values showed a clear negative correlation with age.

Since the FC could potentially be used by clinicians to make relevant management decisions such as the need to perform other diagnostic tests or refer to a gastroenterologist (37,38),

the availability of trustworthy reference values becomes highly desirable. In addition, a better understanding of the factors other than bowel inflammation that affect FC levels would help to make a more accurate interpretation of this surrogate marker. Our study found no correlation between sex or perinatal data and FC levels in healthy infants.

The negative correlation found with weight and BMI was not confirmed by the post-hoc multivariate analysis. This probably indicates that age acts as a confounding factor since it is associated with anthropometric data. However, height showed a negative correlation with FC levels in the post-hoc analysis. This finding has not been previously described and would need to be analyzed in further studies.

The influence of the type of feeding was only studied in those participants under 6 months of age. We found no statistically significant differences between the three groups (exclusive breastfeeding, mixed feeding and formula-fed infants). However, the fact that the median FC in mixed feeding infants (331 mcg/g, IQR 261) was in between the breast (343 mcg/g, IQR 392) and formula-fed ones (274 mcg/g, IQR 210) suggests a possible dose–response. Additional specifically designed studies with a larger sample of infants should help to analyze this effect.

In contrast, and as our principal finding, we observed a negative correlation of FC with age. High FC values have been previously described, especially in infants (39). The ‘immune theory’ has been the most accepted hypothesis concerning this difference with adults. The FC may reflect an increased transepithelial trafficking of neutrophils in a young gut, also influenced by the intestinal colonization process or dietary diversification. The role of infant nutrition has been previously analyzed. The FC is reported to be lower in breast-fed infants than formula-fed infants, even after weaning began. The main hypothesis for this finding is that breastfeeding plays a role in the development of the gut immune system (40,41). However, some other studies do not support these results, and show higher levels in exclusively breast-fed infants (42–44).

Based on our data, we are unable to confirm this ‘immune theory’, but some of our results could possibly be explained in this way. In our group of children under 6 months, the FC pattern was not significantly influenced by the type of feeding. Interestingly, the FC concentrations showed a negative trend from newborns to 11 months of age followed by an increase in the group aged 12 to 23 months. This peak could have several explanations. This age group (12 to 23 months) is exposed to significant environmental and nutritional changes, including increased contact with other children and increased exposition to viral and bacterial infections. Moreover, this is when the toddler’s nutritional patterns become more varied and similar to an adult’s diet. It is known

that all these factors affect the development of the gut immune system and the establishment of a normal bacterial colonization (27). However, the lack of dietary patterns data of the subjects over 6 months of age bounds the ability of our study to explore this possibility. Further studies are necessary to confirm this hypothesis.

There are several limitations to our study. We made a cross-sectional study, so the FC levels were not dynamically monitored. Also, the laboratory test used had a FC detection range between 30 and 1,000 mcg/g (34), the levels above 1,000 mcg/g could not be precisely determined and were analyzed as 1,000 mcg/g. This could imply that the real FC mean and median values were higher than those presented here. However, only eight cases over the total sample suffered from this ceiling effect; so, our main results should not be particularly affected. Additionally, it is impossible to guarantee that the participant children were completely healthy since no other examinations, such as blood tests, upper or lower gastrointestinal endoscopy were performed to exclude any significant gastrointestinal condition. However, performing any of these invasive tests to asymptomatic volunteer children would have been ethically questionable. Nevertheless, all the children with FC concentrations > 50 mcg/g received a follow-up phone call, and none of them reported any significant gastrointestinal symptoms. Finally, our study was developed in a potentially monocultural and socio-economically homogeneous setting. These factors can have an influence through environmental exposures, diet, etc. and limit the extrapolation to other populations. Similar studies should be replicated by other study groups in order to clarify the role of these variables.

In conclusion, FC values in healthy children were higher than those that are considered as altered in adults and showed a negative correlation with age. The reference levels currently used should be particularly questioned in younger children, whose higher FC levels are possibly related to increased mucosal permeability and immature adaptive immunity in infancy. Based on this, it is necessary to reassess the levels of FC considered as upper limits in children by age group and to further study other factors that could influence FC levels in infancy. The data we present could be useful when evaluating FC concentrations in paediatric patients and could help to better interpret the FC levels obtained.

Acknowledgements

We would like to express our sincerest appreciation to the many people—both from the participating Primary Health Care Centres and from the Medical Laboratory Department (Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid)—who have so generously contributed by donating their time, resources, and precious energy to participate in the project.

Funding: There are no funders to report for this submission.

Potential Conflicts of Interest: The authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

Institution where the work originated: Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain.

Ethics boards that approved the study: Ethics and Clinical Research Committee of Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (code R-0063/14) and Central Research Commission of the Madrid Health Service (code 05/15).

References

- Deeke SA, Starr AE, Ning Z, et al. Mucosal-luminal interface proteomics reveals biomarkers of pediatric inflammatory bowel disease-associated colitis. *Am J Gastroenterol* 2018;113(5):713–24.
- Acevedo D, Salvador MP, Girbes J, Estan N. Fecal calprotectin: A comparison of two commercial enzymeimmunoassays and study of fecal extract stability at room temperature. *J Clin Med Res* 2018;10(5):396–404.
- Caccaro R, D'Incà R, Sturniolo GC. Clinical utility of calprotectin and lactoferrin as markers of inflammation in patients with inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2010;6(4):551–8.
- Carroccio A, Iacono G, Cottone M, et al. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from irritable bowel syndrome: A prospective study in adults and children. *Clin Chem* 2003;49(6 Pt 1):861–7.
- Joishy M, Davies I, Ahmed M, et al. Fecal calprotectin and lactoferrin as noninvasive markers of pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;48(1):48–54.
- Pang T, Leach ST, Katz T, Day AS, Ooi CY. Fecal biomarkers of intestinal health and disease in children. *Front Pediatr* 2014;2(January):1–12. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fped.2014.00006/abstract>
- Gisbert JP, McNicholl AG, Gomollon F. Questions and answers on the role of fecal lactoferrin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(11):1746–54.
- Van de Vijver E, Schreuder AB, Nossen WR, Muller Kobold AC, van Rheenen PF, North Netherlands Pediatric IBD Consortium. Safely ruling out inflammatory bowel disease in children and teenagers without referral for endoscopy. *Arch Dis Child* 2012;97(12):1014–8.
- van Rheenen PF, Van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: Diagnostic meta-analysis. *Bmj* 2010;341:c3369.
- Holtman GA, Lisan-van Leeuwen Y, Day AS, et al. Use of laboratory markers in addition to symptoms for diagnosis of inflammatory bowel disease in children: A meta-analysis of individual patient data. *JAMA Pediatr* 2017;171(10):984–91.
- Singh H, Ee L. Recurrent abdominal pain in children: Is colonoscopy indicated? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2019;68(2):214–17.
- Heida A, Park KT, van Rheenen PF. Clinical utility of fecal calprotectin monitoring in asymptomatic patients with inflammatory bowel disease: A systematic review and practical guide. *Inflamm Bowel Dis* 2017;23(6):894–902.
- Ertekin V, Selimoğlu MA, Turgut A, Bakan N. Fecal calprotectin concentration in celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 2010;44(8):544–6.
- Vaos G, Kostakis ID, Zavras N, Chatzemihael A. The role of calprotectin in pediatric disease. *Biomed Res Int* 2013;2013:542363.
- Rumman N, Sultan M, El-Chammas K, et al. Calprotectin in cystic fibrosis. *BMC Pediatr* 2014;14:133.
- Josefsson S, Bunn SK, Domellof M. Fecal calprotectin in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44(4):407–13.
- Campeotto F, Butel MJ, Kalach N, et al. High faecal calprotectin concentrations in newborn infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004;89(4):F353–5.
- Kapel N, Campeotto F, Kalach N, Baldassare M, Butel MJ, Dupont C. Faecal calprotectin in term and preterm neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;51(5):542–7.
- Mendall MA, Chan D, Patel R, Kumar D. Faecal calprotectin: Factors affecting levels and its potential role as a surrogate marker for risk of development of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 2016;16(1):126.
- Grondona A, Silvestri T, Deleonardi G, et al. Evaluation of fecal calprotectin levels in children aged between 1 and 12 months. *Dig Liver Dis* 2014;46:e122.
- Zhu Q, Li F, Wang J, Shen L, Sheng X. Fecal calprotectin in healthy children aged 1–4 years. *PLoS One* 2016;11(3):1–10.
- Nakayuenyongsuk W, Christofferson M, Stevenson DK, Sylvester K, Lee HC, Park KT. Point-of-care fecal calprotectin monitoring in preterm infants at risk for necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 2018;196:98–103.e1.
- Zoppelli L, Güttel C, Bittrich HJ, Andrée C, Wirth S, Jenke A. Fecal calprotectin concentrations in premature infants have a lower limit and show postnatal and gestational age dependence. *Neonatology* 2012;102(1):68–74.
- Zhang M, Zhang X, Zhang J. Diagnostic value of fecal calprotectin in preterm infants with necrotizing enterocolitis. *Clin Lab* 2016;62(5):863–9.
- Oord T, Hornung N. Fecal calprotectin in healthy children. *Scand J Clin Lab Invest* 2014;74(3):254–8.
- Hestvik E, Tumwine JK, Tylleskar T, et al. Faecal calprotectin concentrations in apparently healthy children aged 0–12 years in urban Kampala, Uganda: A community-based survey. *BMC Pediatr* 2011;11:9.
- Rugteit J, Fagerhol MK. Age-dependent variations in fecal calprotectin concentrations in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34(3):323–4; author reply 324–5.
- Herrera OR, Christensen ML, Helms RA. Review article calprotectin: Clinical applications in pediatrics. *J Pediatr Pharmacol Ther* 2016;21(4):1–3.
- Savino F, Castagno E, Calabrese R, Viola S, Oggero R, Miniero R. High faecal calprotectin levels in healthy, exclusively breast-fed infants. *Neonatology* 2010;97(4):299–304.
- Davidson F, Lock RJ. Paediatric reference ranges for faecal calprotectin: A UK study. *Ann Clin Biochem* 2017;54(2):214–218.
- Fagerberg UL, Löf L, Merzoug RD, Hansson LO, Finkel Y. Fecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;37(4):468–72.
- Roca M, Rodriguez Varela A, Donat E, et al. Fecal calprotectin and eosinophil-derived neurotoxin in healthy children between 0 and 12 years. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017;65(4):394–8.
- Kittanakom S, Shajib MS, Garvie K, et al. Comparison of fecal calprotectin methods for predicting relapse of pediatric inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2017;2017:1450970.
- NICE. National Institute for Health and Care Excellence. Faecal calprotectin diagnostic tests for inflammatory diseases of the bowel. Diagnostics guidance. 2013. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/dg11>
- Lin JF, Chen JM, Zuo JH, et al. Meta-analysis: Fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20(8):1407–15.
- Turner D, Ruemmele FM, Orlanski-Meyer E, et al. Management of paediatric ulcerative colitis, Part 1: Ambulatory care- an evidence-based guideline from ECCO and ESPGHAN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2018;67(2):257–91. Available from: https://journals.lww.com/jpgn/fulltext/2018/08000/Management_of_Paediatric_Ulcerative_Colitis_Part.24.aspx#pdf-link
- Akobeng A. Clinical usefulness of the faecal calprotectin test in suspected paediatric inflammatory bowel disease. *Acta Paediatr* 2018;107(11):2019–2023.
- Fagerberg UL, Löf L, Myrdal U, Hansson LO, Finkel Y. Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40(4):450–5.
- Olafsdottir E, Aksnes L, Fluge G, Berstad A. Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. *Acta Paediatr* 2002;91(1):45–50.
- Golden B, Bunn S, Main M. Age-Dependent variations in fecal calprotectin concentrations in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34(3):324. Available from: https://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2002/03000/Age_Dependent_Variations_in_Fecal_Calprotectin.23.aspx
- Cacho NT, Lawrence RM, Bliss JM, Cachon NT. Innate immunity and breast milk. *Front Immunol* 2017;8:8–584.
- Dorosko SM, Mackenzie T, Connor RI. Fecal calprotectin concentrations are higher in exclusively breastfed infants compared to those who are mixed-fed. *Breastfeed Med* 2008;3(2):117–9.
- Asgharshirazi M, Shariat M, Nayeri F, Dalili H, Abdollahi A. Comparison of fecal calprotectin in exclusively breastfed and formula or mixed fed infants in the first six months of life. *Acta Med Iran* 2017;55(1):53–8. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L620842203%0Ahttp://dx.doi.org/10.5812/compred.59992>
- Li F, Ma J, Geng S, Wang J, Ren F, Sheng X. Comparison of the different kinds of feeding on the level of fecal calprotectin. *Early Hum Dev* 2014;90(9):471–5.

9.4.2 COMUNICACIONES EN CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

- Velasco Rodríguez-Belvis M, Plata Fernández C, Viada Bris JF, Leal De Pedro E, Palomino Pérez L, Muñoz Codoceo RA. Calprotectina fecal en lactantes sanos menores de 6 meses: ¿el tipo de lactancia recibida influye en sus valores? Congreso Sociedad Española de Gastroenterología y Hepatología y Nutrición Pediátrica (SEGHPNP). Granada, España. 17/05/2018- 19/05/2018. Comunicación oral breve.



CALPROTECTINA FECAL EN LACTANTES SANOS MENORES DE 6 MESES: ¿EL TIPO DE LACTANCIA RECIBIDA INFLUYE EN SUS VALORES?

Marta Velasco Rodríguez-Belvis (1), Carmen Plata Fernández (1), Javier Francisco Viada Bris (1), Eva Leal de Pedro (2), Elvira Cañedo Villaroya (1), María de los Ángeles Martínez Ibeas (1), Paloma Ferrero Ortega (3), Rosa Ana Muñoz Codoceo (1) y grupo de trabajo.

(1) Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid. (2) Centro de Salud Goya, Madrid. (3) Centro de Salud Alameda, Madrid.






INTRODUCCIÓN

- Estudios previos muestran valores de calprotectina fecal (CF) muy elevados en lactantes sanos.
- Influencia del tipo de alimentación controvertida: algunos trabajos describen niveles superiores en aquellos con lactancia materna, aunque otras publicaciones posteriores no lo confirman.

OBJETIVO

- Analizar la correlación entre el tipo de lactancia recibida y el nivel de CF en lactantes sanos menores de 6 meses.



MATERIAL Y MÉTODOS

- Estudio transversal y descriptivo: enero 2015- diciembre 2016
- Criterios de inclusión: lactantes sanos de 0 a 6 meses que acudieron a uno de los 4 centros de salud participantes para control rutinario o vacunación.
- Criterios de exclusión: ingesta de fármacos, síntomas gastrointestinales, inmunodeficiencia, enfermedad gastrointestinal o autoinmune o hallazgo microbiológico en la muestra.
- Se registró si recibían lactancia materna exclusiva, artificial o mixta.
- Se determinó el nivel de CF (kit Quantum Blue® Calprotectin Extended) y se realizó coprocultivo, estudio de parásitos, rotavirus y adenovirus en heces.
- Análisis de datos: SPSS® Statistics versión 20.






RESULTADOS

- Se incluyeron 104 lactantes, 69 (66,4%) recibían lactancia materna exclusiva, 9 (8,6%) mixta y 26 (25%) artificial.
- Se analizó en cada grupo la presencia de un nivel de CF alterado (>50 µg/g) o normal (<= 50 µg/g), la media y la mediana de CF en µg/g (tabla).

Tipo de lactancia	CF >50 µg/g	CF <= 50 µg/g	CF media	CF mediana
Número de sujetos	Recuento	Recuento	(µg/g)	(µg/g)
(% del total)	% del grupo	% del grupo	(S.D.)	(Intercuartil)
Lactancia materna exclusiva	65	4	42,6	341
	94,2%	5,8%	(354,9-492,4)	(392)
Lactancia artificial	25	1	284,3	274
	96,2%	3,8%	(223,9-344,8)	(210)
Lactancia mixta	8	1	389,2	331
	88,9%	11,1%	(178,4-600)	(263)

- El test de Fisher (> 0,05) indicó ausencia de diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los valores de CF normales o alterados entre los 3 grupos.
- La prueba de Kruskal-Wallis (> 0,05) indicó ausencia de diferencias estadísticamente significativas para la variable CF (µg/g), entre los 3 grupos.








CONCLUSIONES

- Nuestros resultados sugieren que el tipo de lactancia recibida no influye en los niveles de CF en lactantes sanos.
- Se confirma en nuestra muestra la presencia de valores de CF muy superiores al nivel considerado como alterado en adultos (>50 µg/g) y empleado por extensión actualmente en pediatría.
- Sería útil replantear estos valores de referencia tras la realización de estudios diseñados a tal fin.




- Velasco Rodríguez-Belvis M, Plata Fernández C, Viada Bris JF, Martín Peinador Y, Domínguez Ortega G, García Salido A, Bacelo Ruano I, Muñoz Codoceo RA. Calprotectina fecal en niños de 0 a 18 años sanos. Relación con el peso, la talla y el índice de masa corporal. Congreso Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (SEGHPN). Granada, España. 17/05/2018-19/05/2018. Presentación tipo póster.

**CALPROTECTINA FECAL EN NIÑOS DE 0 A 18 AÑOS SANOS:
RELACIÓN CON EL PESO, LA TALLA Y EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL**

Marta Velasco Rodríguez-Belvis (1), Carmen Plata Fernández (1), Javier Francisco Viada Bris (1), Yolanda Martín Peinador (2), Gloria Domínguez Ortega (1), Alberto García Salido (1), Irene Bacelo Ruano (1), Rosa Ana Muñoz Codoceo (1) y grupo de trabajo.

(1) Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid. (2) Centro de Salud Goya, Madrid.

OBJETIVOS

Los valores de calprotectina fecal (CF) pueden alterarse por factores como la edad, la alimentación o la antropometría. Algunos trabajos describen niveles superiores en los niños con mayor índice de masa corporal (IMC), aunque otras publicaciones posteriores no confirman estos resultados. Nuestro objetivo es analizar la correlación entre el peso, talla e IMC y el nivel de CF en niños sanos de 0 a 18 años de nuestro medio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio transversal y descriptivo con voluntarios sanos de 0 a 18 años que acudieron a uno de los 4 centros de salud participantes para un control rutinario o para vacunación, de enero de 2015 a diciembre de 2016. Se excluyeron aquellos con ingesta de fármacos o síntomas gastrointestinales, inmunodeficiencia, enfermedad gastrointestinal o autoinmune o hallazgo microbiológico positivo en la muestra. Se calculó el IMC y la desviación estándar (DE) de peso, talla e IMC para el sexo y edad. Se determinó el nivel de CF y se realizó coprocultivo, detección de parásitos, rotavirus y adenovirus. Los datos se analizaron con el programa SPSS® Statistics versión 20.

RESULTADOS

Se incluyeron 395 sujetos. La CF media fue 191,6 µg/g (IC 95% 168,6-214,6), mediana 77,00 µg/g, amplitud intercuartil 246. El peso, talla e IMC se registraron en 383, 389 y 382 voluntarios respectivamente (resultados en la tabla 1). Se analizó la correlación de peso, talla e IMC en valores absolutos con la CF mediante el coeficiente de correlación de Spearman. En los 3 casos arrojó un valor negativo, con significación bilateral de 0,000 (p <0,05), indicando una correlación negativa entre cada una de las 3 variables y la CF (-1 < r < 0). Se estudió la correlación de la DE de talla, peso e IMC con la CF mediante el coeficiente de correlación de Spearman. La correlación entre la DE de la talla de cada paciente con el nivel de CF tuvo un valor negativo, con una significación bilateral de 0,015 (p <0,05), lo que indicó una correlación negativa entre las variables (-1 < r < 0). Sin embargo, al analizar la relación de la DE de peso e IMC con la CF, el coeficiente de correlación de Spearman arrojó significaciones bilaterales p>0,05, lo que sugiere ausencia de correlación entre dichas variables.

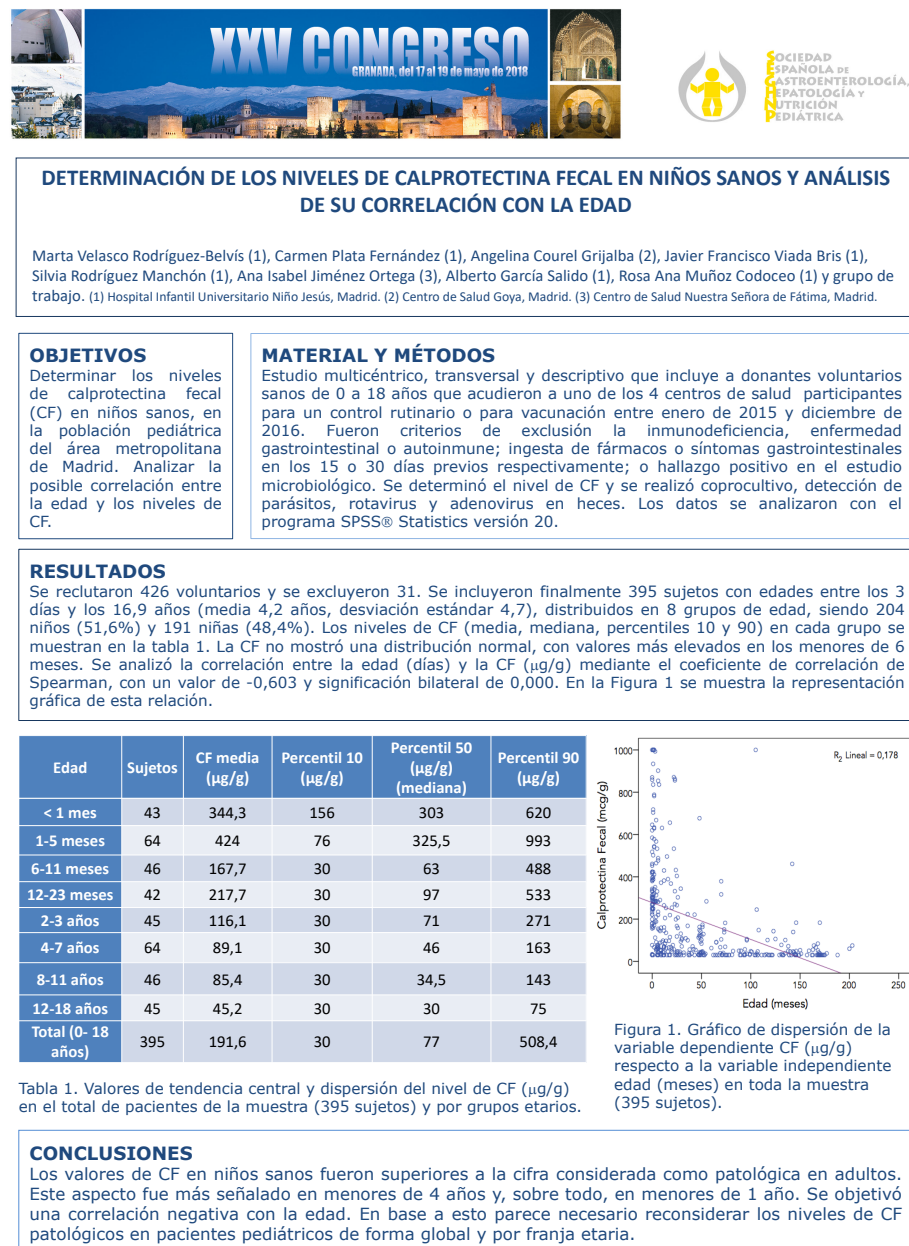
Variable	Sujetos (% del total)	Mínimo-máximo (rango)	Media (IC 95%)	Mediana (amplitud intercuartil)	DE media (IC 95%)	DE mediana (amplitud intercuartil)
Talla	383 (97,0%)	46-185 cm (139)	94,2 cm (90,4 a 98)	85,0 cm (0,6)	-0,3 (-0,4 a -0,1)	-0,3 (1,6)
Peso	389 (98,5%)	2,2-73 Kg (70,8)	17,9 Kg (16,4 a 19,6)	11,8 Kg (18,1)	-0,3 (-0,5 a -0,2)	-0,4 (1,3)
IMC	382 (96,7%)	10,2-25,4 Kg/m2 (15,2)	16,4 Kg/m2 (16,2 a 16,7)	16,3 Kg/m2 (3,1)	-0,2 (-0,4 a -0,1)	-0,365 (1,2)

Tabla 1. Valores de talla, peso e IMC en el total de pacientes de la muestra.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que el peso y el IMC no influyen en los niveles de CF en niños sanos. La correlación negativa entre sus valores absolutos y la CF no se confirman al estudiar la DE de estas variables, por lo que dicho hallazgo puede deberse al factor de confusión edad. Se encuentra en nuestra muestra una correlación negativa entre la talla (en valores absolutos y en DE) y la CF. Este resultado no ha sido descrito previamente y debe confirmarse con nuevos estudios diseñados a tal fin.

- Velasco Rodríguez-Belvis M, Plata Fernández C, Courel Grijalba A, Viada Bris JF, Rodríguez Manchón S, Jiménez Ortega I, García Salido A, Muñoz Codoceo RA. Determinación de los niveles de calprotectina fecal en niños sanos y análisis de su correlación con la edad. Congreso Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (SEGHNP). Granada, España. 17/05/2018-19/05/2018. Presentación tipo póster.



- Velasco Rodríguez-Belvís M, Plata Fernández C, Courel Grijalba A, Viada Bris JF, Sastre Sauce N, Muñoz Codoceo RA. Determinación de los niveles de calprotectina fecal en lactantes sanos y análisis de su correlación con la edad. Congreso Asociación Española de Pediatría (AEP). Zaragoza, España. 07/06/2018- 09/06/2018. Comunicación oral, opta a premio como mejor comunicación oral.
- Velasco Rodríguez-Belvís M, Plata Fernández C, Martín Peinador Y, Viada Bris JF, Asensio Antón J, Muñoz Codoceo RA. Prevalencia de hallazgos microbiológicos patológicos en muestras fecales de pacientes pediátricos asintomáticos de un medio urbano. Congreso Asociación Española de Pediatría (AEP). Zaragoza, España. 07/06/2018- 09/06/2018. Comunicación oral.
- Velasco Rodríguez-Belvís M, Viada Bris JF, Plata Fernández C, Leal De Pedro E, Palomino Pérez L, Muñoz Codoceo RA. ¿Influye el tipo de lactancia recibida en los valores de calprotectina fecal de lactantes sanos menores de seis meses? Congreso Asociación Española de Pediatría (AEP). Zaragoza, España. 07/06/2018- 09/06/2018. Comunicación oral.

Jueves 7 de junio

¿Influye el tipo de lactancia recibida en los valores de calprotectina fecal de lactantes sanos menores de seis meses?
Marta Velasco Rodríguez-Belvis¹, Javier Francisco Viada Bris¹, Carmen Plata Fernández¹, Eva Leal de Pedro², Laura Palomino Pérez¹, Rosa Ana Muñoz Codoceo¹
¹Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid
²CS Goya, Madrid

Confiabilidad de los criterios de Roma IV en español para desórdenes gastrointestinales funcionales en niños
Carlos Velasco Benítez¹, Carmen Ramírez Hernández²
¹Universidad del Valle, Cali, Colombia
²Hospital Regional María Inmaculada, Florencia, Colombia

Desórdenes gastrointestinales funcionales según Roma IV en adolescentes
Carlos Velasco Benítez¹, Carmen Ramírez Hernández²
¹Universidad del Valle, Cali, Colombia
²Hospital Regional María Inmaculada, Florencia, Colombia

Determinación de los niveles de calprotectina fecal en lactantes sanos y análisis de su correlación con la edad
Marta Velasco Rodríguez-Belvis¹, Carmen Plata Fernández¹, Angelina Courel Grijalba², Javier Francisco Viada Bris¹, Natalia Sastre Sauce¹, Rosa Ana Muñoz Codoceo¹
¹Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid
²CS Goya, Madrid

Efecto de dietas a base de proteína láctea o vegetal en un modelo de cerdo lactante
María Rodríguez-Palmero Seuma¹, Cristina de Almagro García¹, Raquel Quintanilla Aguado², Joan Tibau Font³, Meritxell Martín Gari⁴, José CE Serrano Casasola⁴
¹Laboratorios Ordesa, Barcelona
²Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias, Caldes de Montbui, Barcelona
³Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias, Monells, Girona
⁴Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, Lleida

Comunicaciones orales

Infección por *Helicobacter pylori*: ¿hacia dónde vamos?
Rut García Rastrilla, Beatriz Fernández Manso, Cristina Pérez Fernández, Beatriz Martínez Escribano, Tomás Sebastián Viana, Josefa Barrio Torres
Hospital Universitario de Fuenlabrada, Fuenlabrada, Madrid

Pancreatitis en Pediatría: la importancia de su sospecha clínica y diagnóstico precoz. Revisión de una serie de casos en hospital de tercer nivel
Laura Herranz Varas, Neus Roig Abraham, Núria Benet Cubells, M.^a del Mar Martínez Colls, María Méndez Hernández, Montserrat Montraveta Querol
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona

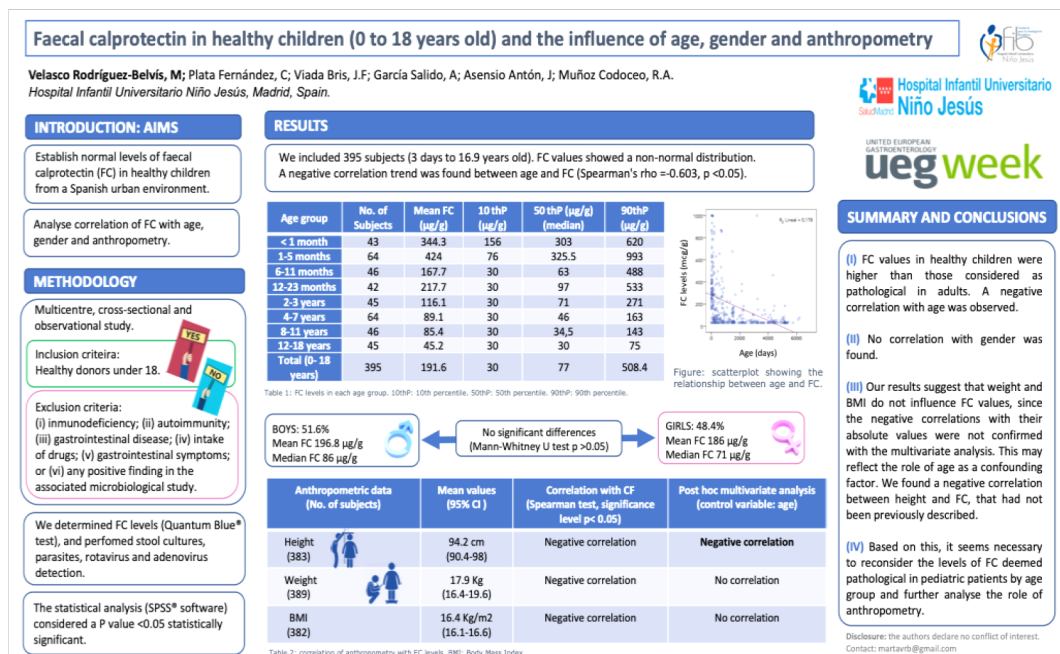
Prevalencia de hallazgos microbiológicos patológicos en muestras fecales de pacientes pediátricos asintomáticos de un medio urbano
Marta Velasco Rodríguez-Belvis¹, Carmen Plata Fernández¹, Yolanda Martín Peinador², Javier Francisco Viada Bris¹, Julia Asensio Antón¹, Rosa Ana Muñoz Codoceo¹
¹Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid
²CS Goya, Madrid

Reproducibilidad 48 horas después de aplicar el cuestionario para síntomas digestivos pediátricos, versión Roma IV (QPGS-RIV) en español para identificar desórdenes gastrointestinales funcionales en niños
Carlos Velasco Benítez, Claudia Ortiz Rivera
Universidad del Valle, Cali, Colombia

Utilidad de las técnicas moleculares frente a otras técnicas directas en la detección de la infección por *H. pylori*
María Pérez Pascual, Pilar Ribes Hernández, Esther Llòrente López, Miguel Gallardo Padilla, M.^a del Carmen Muñoz Egea, Enrique La Orden Izquierdo
Hospital Universitario Infanta Elena, Valdemoro, Madrid



- Velasco Rodríguez-Belvis M, Plata Fernández C, Viada Bris JF, García Salido A, Asensio Antón J, Muñoz Codoceo RA. Faecal calprotectin in healthy children (0 to 18 years old) and the influence of age, gender and anthropometry. UEG Week. Viena, Austria. 24/11/2018- 28/11/2018. Presentación tipo poster en formato físico y tipo e-Poster. Premiada como Poster champ.



- Velasco Rodríguez-Belvis M, Plata Fernández C, Viada Bris JF, García Salido A, Asensio Antón J, Muñoz Codoceo RA. Faecal calprotectin in healthy children. 14th Congress. European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). Copenhagen, Dinamarca. 06/03/2019- 09/03/2019. Presentación tipo póster en formato físico.

Faecal calprotectin in healthy children: are there factors affecting levels other than age?

Hospital Infantil Universitario
Niño Jesús

Velasco Rodríguez-Belvis, M; Plata Fernández, C; Viada Bris, J.F;
García Salido, A; Asensio Antón, J; Muñoz Codoceo, R.A.
Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain.



BACKGROUND: AIMS

- Establish normal levels of faecal calprotectin (FC) in healthy children from a Spanish urban environment.
- Analyse correlation of FC with age, gender and anthropometry.

METHODS

Multicentre, cross-sectional and observational study.

Inclusion criteria:
Healthy donors under 18.

Exclusion criteria:
(i) immunodeficiency; (ii) autoimmunity;
(iii) gastrointestinal disease; (iv) intake of drugs; (v) gastrointestinal symptoms; or (vi) any positive finding in the associated microbiological study.

We determined FC levels (Quantum Blue® test), and performed stool cultures, parasites, rotavirus and adenovirus detection.

The statistical analysis (SPSS® software) considered a P value <0.05 statistically significant.

RESULTS

We included 395 subjects (3 days to 16.9 years old). FC values showed a non-normal distribution. A negative correlation trend was found between age and FC (Spearman's rho = -0.603, p < 0.05).

Age group	No. of Subjects	Mean FC (µg/g)	10thP (µg/g)	50thP (µg/g) (median)	90thP (µg/g)
< 1 month	43	344.3	156	303	620
1-5 months	64	424	76	325.5	993
6-11 months	46	167.7	30	63	488
12-23 months	42	217.7	30	97	533
2-3 years	45	116.1	30	71	271
4-7 years	64	89.1	30	46	163
8-11 years	46	85.4	30	34.5	143
12-18 years	45	45.2	30	30	75
Total (0-18 years)	395	191.6	30	77	508.4

Table 1: FC levels in each age group. 10thP: 10th percentile. 50thP: 50th percentile. 90thP: 90th percentile.

No significant differences
(Mann-Whitney U test p > 0.05)

BOYS: 51.6%
Mean FC 196.8 µg/g
Median FC 86 µg/g

GIRLS: 48.4%
Mean FC 186 µg/g
Median FC 71 µg/g

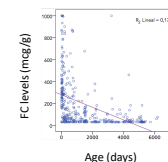


Figure: scatterplot showing the relationship between age and FC.

Anthropometric data (No. Of subjects)	Mean values (95% CI)	Correlation with CF (Spearman test, significance level p<0.05)	Post hoc multivariate analysis (control variable: age)
Height (383)	94.2 cm (90.4-98)	Negative correlation	Negative correlation
Weight (389)	17.9 Kg (16.4-19.6)	Negative correlation	No correlation
BMI (382)	16.4 Kg/m² (16.1-16.6)	Negative correlation	No correlation

Table 2: correlation of anthropometry with FC levels. BMI: Body Mass Index.

CONCLUSIONS

- FC values in healthy children were higher than those considered as pathological in adults. A negative correlation with age was observed.
- No correlation with gender was found.
- Our results suggest that weight and BMI do not influence FC values, since the negative correlations with their absolute values were not confirmed with the multivariate analysis. This may reflect the role of age as a confounding factor. We found a negative correlation between height and FC, that had not been previously described.
- Based on this, it seems necessary to reconsider the levels of FC deemed pathological in pediatric patients by age group and further analyse the role of anthropometry.



Inflammatory Bowel Diseases
14th Congress of ECCO, March 6-9, 2019, Copenhagen/Denmark

Disclosure: the authors declare no conflict of interest.
Contact: martavrb@gmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2844-313X>

- Velasco Rodríguez-Belvis M, Viada Bris JF, Plata Fernández C, García Salido A, Asensio Antón J, Palomino Pérez LM, Domínguez Ortega G, Cañedo Villarroya E, Pedrón Giner C, Rodríguez Manchón S, Bacelo Ruano I, Martínez Ibeas MA, Martín Peinador Y, Leal de Pedro E, Martínez Pérez J, Muñoz Codoceo RA. Faecal calprotectin in healthy children: are there factors affecting levels other than age?. 52nd Annual Meeting European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN). Glasgow, Reino Unido. 05/06/2019- 08/06/2019. Presentación tipo poster en formato físico. Póster seleccionado para Poster Walk.

Faecal calprotectin in healthy children: are there factors affecting levels other than age?



Velasco Rodríguez-Belvis M, Plata Fernández C, Viada Bris JF, García Salido A, Asensio Antón J, Muñoz Codoceo RA. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain.



BACKGROUND: AIMS

(I) Establish normal levels of faecal calprotectin (FC) in healthy children from a Spanish urban environment.
(II) Analyse correlation of FC with age, gender and anthropometry.

METHODS

Multicentre, cross-sectional and observational study.

Inclusion criteria:
Healthy donors under 18.

Exclusion criteria:
(i) immunodeficiency; (ii) autoimmunity;
(iii) gastrointestinal disease; (iv) intake of drugs; (v) gastrointestinal symptoms; or (vi) any positive finding in the associated microbiological study.

We determined FC levels (Quantum Blue® test), and performed stool cultures, parasites, rotavirus and adenovirus detection.

The statistical analysis (SPSS® software) considered a P value <0.05 statistically significant.

RESULTS

We included 395 subjects (3 days to 16.9 years old). FC values showed a non-normal distribution. A negative correlation trend was found between age and FC (Spearman's rho = -0.603, p < 0.05).

Age group	No. of Subjects	Mean FC (µg/g)	10 thP (µg/g)	50 thP (µg/g) (median)	90thP (µg/g)
< 1 month	43	344.3	156	303	620
1-5 months	64	424	76	325.5	993
6-11 months	46	167.7	30	63	488
12-23 months	42	217.7	30	97	533
2-3 years	45	116.1	30	71	271
4-7 years	64	89.1	30	46	163
8-11 years	46	85.4	30	34.5	143
12-18 years	45	45.2	30	30	75
Total (0-18 years)	395	191.6	30	77	508.4

Table 1: FC levels in each age group. 10thP: 10th percentile. 50thP: 50th percentile. 90thP: 90th percentile.

No significant differences (Mann-Whitney U test p > 0.05)

BOYS: 51.6%
Mean FC 196.8 µg/g
Median FC 86 µg/g

GIRLS: 48.4%
Mean FC 186 µg/g
Median FC 71 µg/g

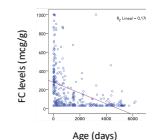


Figure: scatterplot showing the relationship between age and FC.

Anthropometric data (No. Of subjects)	Mean values (95% CI)	Correlation with CF (Spearman test, significance level p<0.05)	Post hoc multivariate analysis (control variable: age)
Height (383)	94.2 cm (90.4-98)	Negative correlation	Negative correlation
Weight (389)	17.9 Kg (16.4-19.6)	Negative correlation	No correlation
BMI (382)	16.4 Kg/m2 (16.1-16.6)	Negative correlation	No correlation

Table 2: correlation of anthropometry with FC levels. BMI: Body Mass Index.

CONCLUSIONS

(I) FC values in healthy children were higher than those considered as pathological in adults. A negative correlation with age was observed.
(II) No correlation with gender was found.
(III) Our results suggest that weight and BMI do not influence FC values, since the negative correlations with their absolute values were not confirmed with the multivariate analysis. This may reflect the role of age as a confounding factor. We found a negative correlation between height and FC, that had not been previously described.
(IV) Based on this, it seems necessary to reconsider the levels of FC deemed pathological in pediatric patients by age group and further analyse the role of anthropometry.



European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
52nd Annual Meeting
5-8 June 2019 - Glasgow - Scotland

Disclosure: the authors declare no conflict of interest.
Contact: martavrb@gmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2844-313X>

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Fargehol MK, Dale I, Anderson T. Release and Quantitation of a Leucocyte Derived Protein (L1). Scand J Haematol. 1980;24:393–8.
2. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. Biochem Biophys Res Commun. 1965;19(6):739.
3. Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Fagerhol MK, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. Lancet. 1990;336:763–5.
4. McMahon CW, Chhabra R. The role of fecal calprotectin in investigating digestive disorders. J Lab Precis Med. 2018;3(19):1–6.
5. Vogl T, Gharibyan AL, Morozova-Roche LA. Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: Self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes. Int J Mol Sci. 2012;13(3):2893–917.
6. Vaos G, Kostakis ID, Zavras N, Chatzemichael A. The role of calprotectin in pediatric disease. Biomed Res Int. 2013;2013:1–8.
7. Ton H, Brandsnes O, Dale S, Holtlund J, Skuibina E, Schjonsby H, et al. Improved assay for fecal calprotectin. Clin Chim Acta. 2000;292:41–54.
8. Vogl T, Leukert N, Barczyk K, Strupat K, Roth J. Biophysical characterization of S100A8 and S100A9 in the absence and presence of bivalent cations. Biochim Biophys Acta. 2006;1763:1298–306.
9. Striz I, Trebichavsky I. Calprotectin – a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. Physiol Res. 2004;53:245–53.
10. Abildtrup M, Kingsley GH, Scott DL. Calprotectin as a Biomarker for Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. J Rheumatol. 2015;42(5):760–70.
11. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen CF, et

- al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol*. 1997;50:113–23.
12. Jeong SJ. The role of fecal calprotectin in pediatric disease. *Korean J Pediatr* [Internet]. 2019;62(8):287–91. Available from: <http://kjp.or.kr/journal/view.php?doi=10.3345/kjp.2019.00059>
13. Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C. Myeloid-related Protein (MRP) 8 and MRP14, Calcium-binding Proteins of the S100 Family, Are Secreted by Activated Monocytes via a Novel, Tubulin-dependent Pathway. *J Biol Chem*. 1997;272(14):9496–502.
14. Kopi TA, Shahrokh S, Kadijani AA, Mirzaei A, Aghdaei HA. The role of serum calprotectin as a novel biomarker in inflammatory bowel diseases: A review study. *Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench*. 2019;12(3):183–9.
15. Røseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjønby H. Assessment of the Neutrophil Dominating Protein Calprotectin in Feces: A Methodologic Study. *Scand J Gastroenterol*. 1992;27(9):793–8.
16. Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ. Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: Performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(1):162–9.
17. Gisbert JP, McNicholl AG. Questions and answers on the role of fecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis*. 2009;41:56–66.
18. Røseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK. Correlation between Faecal Excretion of Indium-111-Labelled Granulocytes and Calprotectin, a Granulocyte Marker Protein, in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Scand J Gastroenterol*. 1999;34(1):50–4.

19. Poullis A, Foster R, Northfield C, Mendall MA. Review article: Faecal markers in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16(4):675–81.
20. Konikoff MR, Denson LA. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12(6):524–34.
21. Tibble J, Teahon K, Thjodleifsson B, Roseth A, Sigthorsson G, Bridger S, et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn ' s disease. *Gut.* 2000;47:506–13.
22. Lundberg J, Hellström P, Fargehol MK, Weitzberg E, Roseth A. Technology insight: calprotectin, lactoferrin and nitric oxide as novel markers of inflammatory bowel disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2005;2(2):96–102.
23. Nancey S, Boschetti G, Moussata D, Draï J, Flourié B. Contribution of Fecal Calprotectin in Monitoring the Inflammatory Bowel Diseases. *Hépatogastro Oncol Dig.* 2015;22(6):477–87.
24. Mesa-Villanueva M, Patiño PJ. Receptores tipo Toll: Entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. *Inmunología.* 2006;25(2):115–30.
25. Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol.* 2009;86(3):557–66.
26. Hyun J, Romero L, Riveron R, Flores C, Kanagavelu S, Chung KD, et al. Human intestinal epithelial cells express IL-10 through Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated epithelial-macrophage crosstalk. *J Innate Immun.* 2015;7(1):87–101.
27. Abraham BP, Kane S. Fecal Markers: Calprotectin and Lactoferrin. *Gastroenterol Clin North Am* [Internet]. 2012;41(2):483–95. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gtc.2012.01.007>

28. Muthas D, Reznichenko A, Balendran CA, Böttcher G, Clausen IG, Kärman Mårdh C, et al. Neutrophils in ulcerative colitis: a review of selected biomarkers and their potential therapeutic implications. *Scand J Gastroenterol*. 2017;52(2):125–35.
29. Hansberry DR, Shah K, Agarwal P, Agarwal N. Fecal Myeloperoxidase as a Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Cureus*. 2017;9(1):1–7.
30. Däbritz J, Musci J, Foell D. Diagnostic utility of faecal biomarkers in patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2014;20(2):363–75.
31. Van Assche G, Assche G Van. Advances in IBD. Fecal Biomarkers for the Diagnosis and Management of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2011;7(6):396–8.
32. Pang T, Leach ST, Katz T, Day AS, Ooi CY. Fecal biomarkers of intestinal health and disease in children. *Front Pediatr*. 2014;2(6):1–12.
33. Umar SB, Dibaise JK. Protein-losing enteropathy: Case illustrations and clinical review. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(1):43–9.
34. Kosek M, Haque R, Lima A, Babji S, Shrestha S, Qureshi S, et al. Fecal markers of intestinal inflammation and permeability associated with the subsequent acquisition of linear growth deficits in infants. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(2):390–6.
35. Crossley J, Elliot R. Simple method for diagnosing protein-losing enteropathies. *Br Med J*. 1977;1(February):428–9.
36. Karbach U, Ewe K, Bodenstein H. Alpha1-antitrypsin, a reliable endogenous marker for intestinal protein loss and its application in patients with Crohn's disease. *Gut*. 1983;24(8):718–23.

37. Angriman I, Scarpa M, D'Inca R, Basso D, Ruffolo C, Polese L, et al. Enzymes in feces: Useful markers of chronic inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta*. 2007;381(1):63–8.
38. Fischbach W, Becker W, Mösser J, Koch W, Reiners C. Faecal alpha-1-antitrypsin and excretion of 111 Indium granulocytes in assessment of disease activity in chronic inflammatory bowel diseases. *Gut*. 1987;28(4):386–93.
39. Thomas D, Sinatra F, Merritt R. Fecal alpha 1-antitrypsin excretion in young people with Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1983;2(3):491–6.
40. Poullis A, Foster R, Shetty A, Fagerhol MK, Mendall MA. Bowel Inflammation as Measured by Fecal Calprotectin : A Link between Lifestyle Factors and Colorectal Cancer Risk Bowel Inflammation as Measured by Fecal Calprotectin : A Link between Lifestyle Factors and Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13:279–84.
41. Walsham NE, Sherwood RA. Fecal Calprotectin in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2016;9:21–9.
42. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*. 2006;55(3):426–31.
43. Carroccio A, Iacono G, Cottone M, Di Prima L, Cartabellotta F, Cavataio F, et al. Diagnostic Accuracy of Fecal Calprotectin Assay in Distinguishing Organic Causes of Chronic Diarrhea from Irritable Bowel Syndrome: A Prospective Study in Adults and Children. *Clin Chem*. 2003;49(6):861–7.
44. Bremner A, Roked S, Robinson R, Phillips I, Beattie M. Faecal calprotectin in children with chronic gastrointestinal symptoms. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2005;94(12):1855–8.
45. Aydemir O, Aydemir C, Sarikabadayi YU, Emre Canpolat F, Erdevi O, Biyikli Z, et al. Fecal calprotectin levels are increased in infants with necrotizing

- enterocolitis. *J Matern Neonatal Med.* 2012;25(11):2237–41.
46. Bin-Nun A, Booms C, Sabag N, Mevorach R, Algur N, Hammerman C. Rapid fecal calprotectin (FC) analysis: Point of care testing for diagnosing early necrotizing enterocolitis. *Am J Perinatol.* 2015;32(4):337–42.
47. Nakayuenyongsuk W, Christofferson M, Stevenson DK, Sylvester K, Lee HC, Park KT. Point-of-Care Fecal Calprotectin Monitoring in Preterm Infants at Risk for Necrotizing Enterocolitis. *J Pediatr.* 2018;196:98-103.e1.
48. Berni Canani R, Rapacciuolo L, Romano MT, Tanrruti De Horatio L, Terrin G, Manguso F, et al. Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Dig Liver Dis.* 2004;36(7):467–70.
49. Ertekin V, Selimoğlu MA, Turgut A, Bakan N. Fecal calprotectin concentration in celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 2010;44(8):544–6.
50. Balamtekin N, Demir H, Baysoy G, Uslu N, Orhan D, Akçören Z, et al. Fecal calprotectin concentration is increased in children with celiac disease: Relation with histopathological findings. *Turkish J Gastroenterol.* 2012;23(5):503–8.
51. Chen C-CC, Huang J-LL, Chang C-JJ, Kong M-SS. Fecal calprotectin as a correlative marker in clinical severity of infectious diarrhea and usefulness in evaluating bacterial or viral pathogens in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;55(5):541–7.
52. Zhang M, Zhang X, Zhang J. Diagnostic Value of Fecal Calprotectin in Preterm Infants with Necrotizing Enterocolitis. *Clin Lab.* 2016;62:863–9.
53. MacQueen BC, Christensen RD, Yost CC, Lambert DK, Baer VL, Sheffield MJ, et al. Elevated fecal calprotectin levels during necrotizing enterocolitis are associated with activated neutrophils extruding neutrophil extracellular traps. *J Perinatol.* 2016;36(10):862–9.
54. Reisinger KW, Van Der Zee DC, Brouwers HAA, Kramer BW, Van Heurn LWE,

- Buurman WA, et al. Noninvasive measurement of fecal calprotectin and serum amyloid A combined with intestinal fatty acid-binding protein in necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2012;47(9):1640–5.
55. Josefsson S, Bunn SK, Domellof M. Fecal calprotectin in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;44(4):407–13.
56. Lozoya Angulo ME, De las Heras Gómez I, Martínez Villanueva M, Noguera Velasco JA, Avilés PLaza F. Calprotectina fecal, marcador eficaz en la diferenciación de enfermedades inflamatorias intestinales y trastornos funcionales gastrointestinales. *Gastroenterol Hepatol*. 2017;40(3):125–31.
57. Choi YJ, Jeong SJ. Is fecal calprotectin always normal in children with irritable bowel syndrome? *Intest Res*. 2019;1–8.
58. Waugh N, Cummins E, Royle P, Kandala NB, Shyangdan D, Arasaradnam R, et al. Faecal calprotectin testing for differentiating amongst inflammatory and non-inflammatory bowel diseases: a systematic review and economic evaluation. April 26 th 2013. (Updated 30th May). *Health Technol Assess (Rockv)*. 2013;17(55):1–211.
59. Foell D, Wittkowski H, Roth J. Monitoring disease activity by stool analyses: From occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut*. 2009;58(6):859–68.
60. Røseth AG, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion*. 1997;58(2):176–80.
61. Bunn SK, Bisset WM, Main MJC, Gray ES, Olson S, Golden BE. Fecal calprotectin: validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001;33(1):14–22.
62. Bunn SK, Bisset WM, Main MJC, Golden BE. Fecal Calprotectin as a Measure of

- Disease Activity in Childhood Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;32(2):171–7.
63. Fagerberg UL, Lööf L, Merzoug RD, Hansson L-O, Finkel Y. Fecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;37(4):468–72.
64. Fagerberg UL, Lööf L, Myrdal U, Hansson L-O, Finkel Y. Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;40(4):450–5.
65. Oord T, Hornung N. Fecal calprotectin in healthy children. *Scand J Clin Lab Invest.* 2014;74(3):254–8.
66. Von Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, Reese GE, Darzi AW, Teare JP, et al. Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(4):803–13.
67. Henderson P, Anderson NH, Wilson DC. The Diagnostic Accuracy of Fecal Calprotectin During the Investigation of Suspected Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol.* 2014;109:637–45.
68. Ashorn S, Honkanen T, Kolho K-L, Ashorn M, Välineva T, Wei B, et al. Fecal Calprotectin levels and Serological Responses to Microbial Antigens among Children and Adolescents with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(2):199–205.
69. Henderson P, Casey A, Lawrence SJ, Kennedy N a, Kingstone K, Rogers P, et al. The diagnostic accuracy of fecal calprotectin during the investigation of suspected pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(6):941–9.
70. Holtman GA, Lisman-van Leeuwen Y, Reitsma JB, Berger MY. Noninvasive Tests

- for Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis. *Pediatrics*. 2016;137(1):1–11.
71. Minar P, Haberman Y, Jurickova I, Wen T, Rothenberg ME, Kim M-O, et al. Utility of Neutrophil Fcγ Receptor I (CD64) Index as a Biomarker for Mucosal Inflammation in Pediatric Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(6):1037–48.
72. Heida A, Van De Vijver E, Van Ravenzwaaij D, Van Biervliet S, Hummel TZ, Yuksel Z, et al. Predicting inflammatory bowel disease in children with abdominal pain and diarrhoea: Calgranulin-C versus calprotectin stool tests. *Arch Dis Child*. 2018;103(6):565–71.
73. Heida A, Holtman GA, Lisman-Van Leeuwen Y, Berger MY, Van Rheeën PF. Avoid endoscopy in children with suspected inflammatory bowel disease who have normal calprotectin levels. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62(1):47–9.
74. Holtman GA, Lisman-Van Leeuwen Y, Kollen BJ, Norbruis OF, Escher JC, Kindermann A, et al. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin for pediatric inflammatory bowel disease in primary care: A prospective cohort study. *Ann Fam Med*. 2016;14(5):437–45.
75. Dilillo D, Zuccotti GV, Galli E, Meneghin F, Dell'Era A, Penagini F, et al. Noninvasive testing in the management of children with suspected inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2019;54(5):586–91.
76. Yang Z, Clark N, Park KT. Effectiveness and cost-effectiveness of measuring fecal calprotectin in diagnosis of inflammatory bowel disease in adults and children. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(2):253-262.e2.
77. Zhang W, Wong CH, Chavannes M, Mohammadi T, Rosenfeld G. Cost-effectiveness of faecal calprotectin used in primary care in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *BMJ Open*. 2019;9(4):1–12.
78. McCann RK, Smith K, Gaya DR. A prospective single centre pilot evaluation of a

- serum calprotectin assay in unselected GI patients. Clin Biochem [Internet]. 2017;50(9):533–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.01.006>
79. Fukunaga S, Kuwaki K, Mitsuyama K, Takedatsu H, Yoshioka S, Yamasaki H, et al. Detection of calprotectin in inflammatory bowel disease: Fecal and serum levels and immunohistochemical localization. *Int J Mol Med*. 2018;41(1):107–18.
 80. Lin W-C, Wong J-M, Tung C-C, Lin C-P, Chou J-W, Wang H-Y, et al. Fecal calprotectin correlated with endoscopic remission for Asian inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol*. 2015;21(48):13566–73.
 81. D’Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(12):2218–24.
 82. Aomatsu T, Yoden A, Matsumoto K, Kimura E, Inoue K, Andoh A, et al. Fecal calprotectin is a useful marker for disease activity in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2011;56(8):2372–7.
 83. Sipponen T, Kärkkäinen P, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, et al. Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn’s disease and histological findings. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28(10):1221–9.
 84. Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummeler M, Vavricka SR, Bruegger LE, et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the simple endoscopic score for crohn’s disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(1):162–9.
 85. Lee S-H, Kim M-J, Chang K, Song EM, Hwang SW, Park SH, et al. Fecal calprotectin predicts complete mucosal healing and better correlates with the ulcerative colitis endoscopic index of severity than with the Mayo endoscopic subscore in patients with ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol*. 2017;17(1):1–10.

86. Patel A, Panchal H, Dubinsky MC. Fecal Calprotectin Levels Predict Histological Healing in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2017;23(9):1600–4.
87. Rokkas T, Portincasa P, Koutroubakis IE. Fecal calprotectin in assessing inflammatory bowel disease endoscopic activity: A diagnostic accuracy meta-analysis. *J Gastrointest Liver Dis*. 2018;27(3):299–306.
88. Yamamoto T, Shiraki M, Bamba T, Umegae S, Matsumoto K. Fecal calprotectin and lactoferrin as predictors of relapse in patients with quiescent ulcerative colitis during maintenance therapy. *Int J Colorectal Dis*. 2014;29(4):485–91.
89. Yamamoto T, Shimoyama T, Matsumoto K. Consecutive monitoring of faecal calprotectin during mesalazine suppository therapy for active rectal inflammation in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;42(5):549–58.
90. García-Sánchez V, Iglesias-Flores E, González R, Gisbert JP, Gallardo-Valverde JM, González-Galilea Á, et al. Does fecal calprotectin predict relapse in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis? *J Crohn's Colitis*. 2010;4(2):144–52.
91. Gisbert JP, Bermejo F, Pérez-Calle J-L, Taxonera C, Vera I, McNicholl AG, et al. Fecal calprotectin and lactoferrin for the prediction of inflammatory bowel disease relapse. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(8):1190–8.
92. De Vos M, Louis EJ, Jahnsen J, Vandervoort JGP, Noman M, Dewit O, et al. Consecutive fecal calprotectin measurements to predict relapse in patients with ulcerative colitis receiving infliximab maintenance therapy. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(10):2111–7.
93. Garcia-Planella E, Mañosa M, Chaparro M, Beltrán B, Barreiro-de-Acosta M, Gordillo J, et al. Serial semi-quantitative measurement of fecal calprotectin in patients with ulcerative colitis in remission. *Scand J Gastroenterol*. 2018;53(2):152–7.
94. El-Matary W, Abej E, Deora V, Singh H, Bernstein CN. Impact of Fecal

- Calprotectin Measurement on Decision-Making in Children with Inflammatory Bowel Disease. *Front Pediatr*. 2017;5(7):1–7.
95. Kolho K-L, Turner D. Fecal Calprotectin and Clinical Disease Activity in Pediatric Ulcerative Colitis. *ISRN Gastroenterol*. 2013;2013:1–5.
 96. Cozijnsen MA, Ben Shoham A, Kang B, Choe B-H, Choe YH, Jongsma MME, et al. Development and Validation of the Mucosal Inflammation Noninvasive Index For Pediatric Crohn's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;(May):1–9.
 97. Ruemmele FM, Veres G, Kolho KL, Griffiths A, Levine A, Escher JC, et al. Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease. *J Crohn's Colitis*. 2014;8(10):1179–207.
 98. Turner D, Ruemmele FM, Orlanski-Meyer E, Griffiths AM, Martin de Carpi J, Bronsky J, et al. Management of paediatric ulcerative colitis, Part 1: ambulatory care- an evidence-based guideline from ECCO and ESPGHAN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018;67(2):257-291.
 99. Cozijnsen MA, Turner D. Optimizing fecal calprotectin accuracy - more than one way to skin that cat! *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356519306597>
 100. Dhaliwal J, Leach S, Katz T, Nahidi L, Pang T, Lee JM, et al. Intestinal inflammation and impact on growth in children with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015;60(4):521–6.
 101. Borowitz D, Durie PR, Clarke LL, Werlin SL, Taylor CJ, Semler J, et al. Gastrointestinal Outcomes and Confounders in Cystic Fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;41:273–85.
 102. Rumman N, Sultan M, El-Chammas K, Goh V, Salzman N, Quintero D, et al. Calprotectin in cystic fibrosis. *BMC Pediatr*. 2014;14(1):133.
 103. Adriaanse MPM, Van Der Sande LJTM, Van Den Neucker AM, Menheere PPCA,

- Dompeling E, Buurman WA, et al. Evidence for a cystic fibrosis enteropathy. *PLoS One*. 2015;10(10):1–15.
104. Werlin SL, Benuri-Silbiger I, Kerem E, Adler SN, Goldin E, Zimmerman J, et al. Evidence of intestinal inflammation in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51(3):304–8.
 105. Ellemunter H, Engelhardt A, Schüller K, Steinkamp G. Fecal Calprotectin in Cystic Fibrosis and Its Relation to Disease Parameters. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;65(4):438–42.
 106. Parisi GF, Papale M, Rotolo N, Aloisio D, Tardino L, Scuderi MG, et al. Severe disease in Cystic Fibrosis and fecal calprotectin levels. *Immunobiology*. 2017;222(3):582–6.
 107. Lee JM, Leach ST, Katz T, Day AS, Jaffe A, Ooi CY. Update of faecal markers of inflammation in children with cystic fibrosis. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:1–6.
 108. Garg M, Leach ST, Coffey MJ, Katz T, Strachan R, Pang T, et al. Age-dependent variation of fecal calprotectin in cystic fibrosis and healthy children. *J Cyst Fibros*. 2017;16(5):631–6.
 109. Ellemunter H, K S, Steinkamp G. Fecal calprotectin concentrations in young children with cystic fibrosis: Authors response. *J Cyst Fibros*. 2017;17(1):e8–9.
 110. Schnapp Z, Hartman C, Livnat G, Shteinberg M, Elenberg Y. Decreased Fecal Calprotectin Levels in Cystic Fibrosis Patients After Antibiotic Treatment for Respiratory Exacerbation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2019;68(2):282–4.
 111. Enaud R, Hooks KB, Barre A, Barnette T, Hubert C, Massot M, et al. Intestinal Inflammation in Children with Cystic Fibrosis Is Associated with Crohn's-Like Microbiota Disturbances. *J Clin Med*. 2019;8(5):645.
 112. Espín Jaime B, Díaz Martín JJ, Blesa Baviera LC, Claver Monzón Á, Hernández Hernández A, García Burriel JI, et al. Alergia a las proteínas de leche de vaca no

- mediada por IgE: documento de consenso de la Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (SEGHNP), la Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria (AEPAP), la Sociedad Esp. An Pediatría. 2019;90(3):1–42.
113. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Report of the NIAID-Sponsored Expert Panel. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(60):1–135.
 114. Koletzko S, Niggemann B, Arato A, Dias JA, Heuschkel R, Husby S, et al. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: Espghan gi committee practical guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;55(2):221–9.
 115. Pohl J, Azuma L, Watts M, Easley D. Fecal calprotectin and Cow's Milk Protein Allergy in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;41(4):515.
 116. Beşer ÖF, Sancak S, Erkan T, Kutlu T, Çokugras H, Çokugras FÇ. Can fecal calprotectin level be used as a markers of inflammation in the diagnosis and follow-up of cow's milk protein allergy? *Allergy, Asthma Immunol Res*. 2014;6(1):33–8.
 117. Trillo Belizón C, Ortega Páez E, Medina Claros A, Rodríguez Sánchez I, Reina González AM, Vera Medialdea R, et al. Faecal calprotectin as an aid to the diagnosis of non-IgE mediated cow's milk protein allergy. *An Pediatría (English Ed)*. 2016;84(6):318–23.
 118. Baldassarre ME, Panza R, Laforgia N. Usefulness of Faecal Markers in Cow's Milk Protein Immunomediated Reactions. In: *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects*. 2016. p. 213–42.
 119. Baldassarre ME, Laforgia N, Fanelli M, Laneve A, Grosso R, Lifschitz C. *Lactobacillus GG Improves Recovery in Infants with Blood in the Stools and*

- Presumptive Allergic Colitis Compared with Extensively Hydrolyzed Formula Alone. *J Pediatr*. 2010;156(3):397–401.
120. Merras-Salmio L, Kolho K-L, Pelkonen AS, Kuitunen M, Mäkelä MJ, Savilahti E. Markers of gut mucosal inflammation and cow's milk specific immunoglobulins in non-IgE cow's milk allergy. *Clin Transl Allergy*. 2014;4(1):1–8.
 121. Ataee P, Zoghali M, Nikkhoo B, Ghaderi E, Mansouri M, Nasiri R, et al. Diagnostic Value of Fecal Calprotectin in Response to Mother's Diet in Breast-Fed Infants with Cow's Milk Allergy Colitis. *Iran J Pediatr*. 2018;28(4):1–5.
 122. Seo SC, Ahn SH, Ri S, Yoon Y, Byeon JH, Kim SH, et al. Elevated fecal calprotectin levels are associated with severity of atopic dermatitis in children. *Asian Pacific J Allergy Immunol*. 2018;36(2):82–7.
 123. Orivuori L, Mustonen K, de Goffau MC, Hakala S, Paasela M, Roduit C, et al. High level of fecal calprotectin at age 2 months as a marker of intestinal inflammation predicts atopic dermatitis and asthma by age 6. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(5):928–39.
 124. Khan S. Testing for fecal calprotectin in food protein–induced enterocolitis syndrome. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018;28(4):287–8.
 125. Kristjánsson G, Högman M, Venge P, Hällgren R. Gut mucosal granulocyte activation precedes nitric oxide production: Studies in coeliac patients challenged with gluten and corn. *Gut*. 2005;54(6):769–74.
 126. Husby S, Koletzko S, Korponay-szabo IR. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(1):136–60.
 127. Lancaster-Smith M, Packer S, Kumar PJ, Harries JT. Cellular infiltrate of the jejunum after re introduction of dietary gluten in children with treated coeliac disease. *J Clin Pathol*. 1976;29(7):587–91.

128. Capone P, Rispo A, Imperatore N, Caporaso N, Tortora R, Capone P, et al. Faecal calprotectin in coeliac disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(2):611–2.
129. Montalto M, Santoro L, Curigliano V, D’Onofrio F, Cammarota G, Panunzi S, et al. Faecal calprotectin concentrations in untreated coeliac patients. *Scand J Gastroenterol*. 2007;42(8):957–61.
130. Gonzalez MD, Wilen CB, Burnham CAD. Markers of Intestinal Inflammation for the Diagnosis of Infectious Gastroenteritis. *Clin Lab Med*. 2015;35(2):333–44.
131. Sýkora J, Siala K, Huml M, Varvaovská J, Schwarz J, Pomahaová R. Evaluation of faecal calprotectin as a valuable non-invasive marker in distinguishing gut pathogens in young children with acute gastroenteritis. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2010;99(9):1389–95.
132. Duman M, Gencpinar P, Biçmen M, Arslan N, Özden Ö, Üzümlü Ö, et al. Faecal calprotectin: Can be used to distinguish between bacterial and viral gastroenteritis in children? *Am J Emerg Med*. 2015;33(10):1436–9.
133. Park Y, Son M, Jekarl DW, Choi HY, Kim SY, Lee S. Clinical Significance of Inflammatory Biomarkers in Acute Pediatric Diarrhea. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2019;22(4):369.
134. Alibrahim B, Aljasser M, Salh B. Faecal calprotectin use in inflammatory bowel disease and beyond: A mini-review. *Can J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2015;29(3):157–63. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L603694671%5Cnhttp://rug.on.worldcat.org/atoztitles/link/?sid=EMBASE&issn=22912797&id=doi:&atitle=Fecal+calprotectin+use+in+inflammatory+bowel+disease+and+beyond%3A+A+mini-review&sti>
135. Lundgren D, Eklöf V, Palmqvist R, Hultdin J, Karling P. Proton pump inhibitor use is associated with elevated faecal calprotectin levels. A cross-sectional study on subjects referred for colonoscopy. *Scand J Gastroenterol*. 2019;54(2):152–7.

136. Poullis A, Foster R, Mendall MA. Proton pump inhibitors are associated with elevation of faecal calprotectin and may affect specificity. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003;15(5):573–4.
137. Bucher HC, Guyatt GH, Cook DJ, Holbrook A, Mcalister FA. Applying Clinical Trial Results . Part A: How to Use an Article Measuring the Effect of an Intervention on Surrogate End Points. *JAMA*. 1999;282(8):771–8.
138. Li F, Ma J, Geng S, Wang J, Ren F, Sheng X. Comparison of the different kinds of feeding on the level of fecal calprotectin. *Early Hum Dev*. 2014;90(9):471–5.
139. Degraeuwe PLJ, Beld MPA, Ashorn M, Canani RB, Day AS, Diamanti A, et al. Faecal Calprotectin in Suspected Paediatric Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015;60(3):339–46.
140. Herrera OR, Christensen ML, Helms RA. Review Article Calprotectin : Clinical Applications in Pediatrics. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2016;21(4):308–21.
141. Fagerberg UL, Lööf L, Lindholm J, Hansson L-O, Finkel Y. Fecal Calprotectin: A Quantitative Marker of Colonic Inflammation in Children With Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;45:414–20.
142. Secretaría de Estado. II Plan Estratégico Nacional de Infancia y Adolescencia 2013-2016 (II PENIA) [Internet]. Ministerio de Sanidad, Servicio sociales e Igualdad 2013 p. 1–29. Available from: http://www.observatoriodelainfancia.msssi.gob.es/documentos/PENIA_2013-2016.pdf
143. Laforgia N, Baldassarre M, Pontrelli G, Indrio F, Altomare M, Bitonto G, et al. Calprotectin levels in meconium. *Acta Paediatr*. 2003;92(4):463–6.
144. Lisowska-Myjak B, Skarzyńska E, Zytyńska-Daniluk J. Calprotectin in serially collected meconium portions as a biomarker for intrauterine fetal environment. *Fetal Diagn Ther*. 2018;43(1):68–71.

145. Nissen AC, Van Gils CE, Menheere PP, Van den Neucker AM, Van der Hoeven MA, Forget P-P. Fecal Calprotectin in Healthy Term and Preterm Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:107–8.
146. Campeotto F, Butel MJ, Kalach N, Derrieux S, Aubert-Jacquin C, Barbot L, et al. High faecal calprotectin concentrations in newborn infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004;89(4):F353-5.
147. Asgarshirazi M, Shariat M, Nayeri F, Dalili H, Abdollahi A. Comparison of Fecal Calprotectin in Exclusively Breastfed and Formula or Mixed Fed Infants in the First Six Months of Life. *Acta Med Iran.* 2017;55(1):53–8.
148. Baldassarre ME, Altomare MA, Fanelli M, Carbone D, Di Bitonto G, Mautone A, et al. Does Calprotectin Represent a Regulatory Factor in Host Defense or a Drug Target in Inflammatory Disease? *Endocrine, Metab Immune Disord Targets.* 2007;7(1):1–5.
149. Savino F, Castagno E, Calabrese R, Viola S, Oggero R, Miniero R. High faecal calprotectin levels in healthy, exclusively breast-fed infants. *Neonatology.* 2010;97(4):299–304.
150. Olafsdottir E, Aksnes L, Fluge G, Berstad A. Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. *Acta Paediatr.* 2002;91(1):45–50.
151. Rugtveit J, Fagerhol MK, Golden B, Bunn S, Main M. Age-Dependent Variations in Fecal Calprotectin Concentrations in Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;34(3):324.
152. Lee YM, Min CY, Choi YJ, Jeong SJ. Delivery and feeding mode affects fecal calprotectin levels in infants under 7 months old. *Early Hum Dev.* 2017;108:45–8.

153. Dorosko SM, Mackenzie T, Connor RI. Fecal calprotectin concentrations are higher in exclusively breastfed infants compared to those who are mixed-fed. *Breastfeed Med.* 2008;3(2):117–9.
154. Liu J-R, Sheng X-Y, Hu Y-Q, Yu X-G, Westcott JE, Miller L V, et al. Fecal calprotectin levels are higher in rural than in urban Chinese infants and negatively associated with growth. *BMC Pediatr.* 2012;12(129):1–6.
155. Hestvik E, Tumwine JK, Tylleskar T, Grahnquist L, Ndeezi G, Kaddu-Mulindwa DH, et al. Faecal calprotectin concentrations in apparently healthy children aged 0-12 years in urban Kampala, Uganda: a community-based survey. *BMC Pediatr.* 2011;11(9):1–7.
156. Roca M, Varela AR, Donat E, Cano F, Hervas D, Armisen A, et al. Fecal Calprotectin and Eosinophil-derived Neurotoxin in Healthy Children between 0 and 12 Years. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;65(4):394–8.
157. Grondona A., Silvestri T, Deleonardi G, Alboresi S, Felicani L, Vallini M, et al. Evaluation of fecal calprotectin levels in children aged between 1 and 12 months. *Dig Liver Dis.* 2014;46:e122.
158. Li F, Ma J, Geng S, Wang J, Liu J, Zhang J, et al. Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months. *PLoS One.* 2015;10(3):1–12.
159. Davidson F, Lock RJ. Paediatric reference ranges for faecal calprotectin : a UK study. *Ann Clin Biochem.* 2016;54(2):214–8.
160. Zhu Q, Li F, Wang J, Shen L, Sheng X. Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years. *PLoS One.* 2016;11(3):1-10.
161. Song JY, Lee YM, Choi YJ, Jeong SJ. Fecal calprotectin level in healthy children aged less than 4 years in South Korea. *J Clin Lab Anal.* 2017;1–5.
162. Soto-Méndez M-J, Romero-Abal M-E, Schümann K, Gil Á, Solomons NW.

- Normative Fecal Calprotectin Concentrations in Guatemalan Preschoolers Are High Relative to Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;64(2):238–44.
163. Joshi S, Lewis SJ, Creanor S, Ayling RM. Age-related faecal calprotectin, lactoferrin and tumour M2-PK concentrations in healthy volunteers. *Ann Clin Biochem.* 2010;47(3):259–63.
164. Campeotto F, Kalach N, Lapillonne A, Butel MJ, Dupont C, Kapel N. Time course of faecal calprotectin in preterm newborns during the first month of life. *Acta Paediatr.* 2007;96:1531–5.
165. Golden B, Bunn SKS, Main M, Rugtveit J, Fagerhol MK, Golden B, et al. Age-Dependent Variations in Fecal Calprotectin Concentrations in Children Never Miss an Issue. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;34(3):324.
166. Goldman A, Thorpe L, Goldblum R, Hanson L. Anti-inflammatory properties of human milk. *Acta Paediatr Scand.* 1986;75(5):689–95.
167. Weaver LT, Laker MF, Nelson R. Intestinal permeability in the newborn. *Arch Dis Child.* 1984;59(3):236–41.
168. Catassi C, Bonucci A, Coppa G V, Carlucci A, Giorgi PL. Intestinal Permeability Changes during the First Month: Effect of Natural versus Artificial Feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1995;21:383–6.
169. Ezri J, Nydegger A. Pediatrics. Fecal calprotectin in children: use and interpretation. *Rev Med Suisse.* 2011;7(277):69–70.
170. Campbell DI, Elia M, Lunn PG. Growth Faltering in Rural Gambian Infants Is Associated with Impaired Small Intestinal Barrier Function , Leading to Endotoxemia and Systemic Inflammation. *J Nutr.* 2003;133(5):1332–8.
171. Mendall MA, Chan D, Patel R, Kumar D. Faecal calprotectin: factors affecting levels and its potential role as a surrogate marker for risk of development of Crohn’s Disease. *BMC Gastroenterol.* 2016;16(126):1–7.

172. Kant P, Fazakerley R, Hull MA. Faecal calprotectin levels before and after weight loss in obese and overweight subjects. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(2):317–9.
173. Spagnuolo MI, Cicalese MP, Caiazzo MA, Franzese A, Squeglia V, Assante LR, et al. Relationship between severe obesity and gut inflammation in children : what's next ? *Ital J Pediatr*. 2010;36(66):1–6.
174. Tibble J, Sighthorsson G, Foster R, Scott D, Fargehol M, Roseth A, et al. High prevalence of NSAID enteropathy as shown by a simple faecal test. *Gut*. 1999;45(3):362–6.
175. Rendek Z, Falk M, Grodzinsky E, Wahlin K, Kechagias S, Svernlöv R, et al. Effect of oral diclofenac intake on faecal calprotectin. *Scand J Gastroenterol*. 2016;51(1):28–32.
176. Kim SY, Lee NM, Yun SW, Chae SA, Lim IS, Choi ES, et al. Influence of proton pump inhibitor therapy on intestinal inflammation assessed by fecal calprotectin in pediatric patients. *Korean J Pediatr*. 2019;(July):1–20.
177. Imhann F, Vich Vila A, Bonder MJ, Lopez Manosalva AG, Koonen DPY, Fu J, et al. The influence of proton pump inhibitors and other commonly used medication on the gut microbiota. *Gut Microbes*. 2017;8:351–8.
178. P. Gisbert J, González-Lama Y, Maté J. Papel de los marcadores biológicos en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol*. 2007;30(3):117–29.
179. Husebye E, Tøn H, Johne B. Biological variability of fecal calprotectin in patients referred for colonoscopy without colonic inflammation or neoplasm. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(9):2683–7.
180. Naismith GD, Smith LA, Barry SJE, Munro JI, Laird S, Rankin K, et al. A prospective single-centre evaluation of the intra-individual variability of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37(6):613–21.

181. Calafat M, Cabré E, Mañosa M, Lobatón T, Marín L, Domènech E. High within-day variability of fecal calprotectin levels in patients with active ulcerative colitis: what is the best timing for stool sampling? *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(5).
182. Burri E, Manz M, Rothen C, Rossi L, Beglinger C, Lehmann FS. Monoclonal antibody testing for fecal calprotectin is superior to polyclonal testing of fecal calprotectin and lactoferrin to identify organic intestinal disease in patients with abdominal discomfort. *Clin Chim Acta*. 2013;416:41–7.
183. Røseth AG, Aadland E, Grzyb K. Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2004;39(10):1017–20.
184. Bühlmann Laboratories A. BÜHLMANN fCAL® ELISA Calprotectin. For In Vitro Diagnostic Use. 2018.
185. Bio-Rad Laboratories I. ELISA - The Essentials. In: ELISA - The Essentials [Internet]. 2017. p. 3–4. Available from: <https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2017/an-introduction-to-elisa/elisa-the-essentials.pdf>
186. Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, Becker K, Friedrich AW, Rueffer A, et al. Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *Gut*. 2007;56(12):1706–13.
187. He ZX, Shi LC, Ran XY, Li W, Wang XL, Wang FK. Development of a lateral flow immunoassay for the rapid diagnosis of invasive candidiasis. *Front Microbiol*. 2016;7(1451):1–7.
188. Sydora MJ, Sydora BC, Fedorak RN. Validation of a point-of-care desk top device to quantitate fecal calprotectin and distinguish inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *J Crohn's Colitis*. 2012;6(2):207–14.
189. Noebauer B, Ramic L, Konstantin A, Zachbauer C, Einwallner E. Analytical evaluation of a fully automated immunoassay for faecal calprotectin in a

- paediatric setting. *Biochem.* 2017;27(3):1–8.
190. Oyaert M, Boel A, Jacobs J, Van Den Bremt S, De Sloovere M, Vanpoucke H, et al. Analytical performance and diagnostic accuracy of six different faecal calprotectin assays in inflammatory bowel disease. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(10):1564–73.
 191. Heida A, Knol M, Kobold AM, Bootsman J, Dijkstra G, van Rheeën PF. Agreement Between Home-Based Measurement of Stool Calprotectin and ELISA Results for Monitoring Inflammatory Bowel Disease Activity. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017;15(11):1742-1749.
 192. Hejl J, Theede K, Møllgren B, Madsen KV, Heidari A, Steig A, et al. Point of care testing of fecal calprotectin as a substitute for routine laboratory analysis. *Pract Lab Med.* 2018;10:10–4.
 193. Bühlmann Laboratories A. IB Doc ® Quick Guide. Calprotectin Home Test. [Internet]. 2017. Available from: https://www.alphalabs.co.uk/media/productfile/file/i/b/ibdoc_quickguide_v1.6.pdf
 194. Sunde K, Schneider M, Nilsen T, Niederberger C, Jermann T, Sundrehagen E. Analytical performance of a fecal calprotectin petia test. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53:S260.
 195. Ikhtaire S, Shajib MS, Reinisch W, Khan WI. Fecal calprotectin: its scope and utility in the management of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2016;51(5):434–46.
 196. Juricic G, Brencic T, Kuna AT, Njegovan M, Honovic L. Faecal calprotectin determination: impact of preanalytical sample treatment and stool consistency on within- and between-method variability. *Biochem Med.* 2019;29(1):1–11.
 197. Bühlmann Laboratories A. BÜHLMANN Smart-Prep. Fecal sample preparation kit.

- [Internet]. 2015. Available from: https://buhlmannlabs.com/wp-content/uploads/BUHLMANN-Smart-Prep-B-CAL-RD-U_2015-12-09.pdf
198. Instituto de Estadística. Mapas de Zonas Básicas de Salud del Área Única de la Comunidad de Madrid [Internet]. Available from: <http://www.madrid.org/iestadis/fijas/estructu/general/territorio/estructucartemzbs.htm>
199. Organización Mundial de la Salud. Constitution of the World Health Organization. Principles. [Internet]. Official Records of the World Health Organization, N° 2 1948 p. 100. Available from: <http://apps.who.int/gb/bd/PDF/bd47/EN/constitution-en.pdf?ua=1>
200. Lane MM, Czyzewski DI, Chumpitazi BP, Shulman RJ. Reliability and Validity of a Modified Bristol Stool Form Scale for Children. J Pediatr. 2011;159(3):437–41.
201. Blasco JBB. Epidemiología de las Gastroenteritis Agudas Víricas. Sociedad Española de Epidemiología; 2007. 99–114 p.
202. Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Calendario de vacunaciones de la Comunidad de Madrid (nacidos hasta el 30 de junio de 2016) [Internet]. 2016. Available from: <http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadertype=Content-disposition&blobheadertype=cadena&blobheadertype=filename%3DCAL+VAC+INFANTIL+CM+1er+semestre+2016.pdf&blobheadertype=language%3Des%26site%3DPortal>
203. Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Calendario de vacunaciones de la Comunidad de Madrid (nacidos desde el 1 de julio de 2016) [Internet]. 2016. Available from: <http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadertype=Content-disposition&blobheadertype=cadena&blobheadertype=filename%3DCAL+VAC+INFANTIL+CM+1er+semestre+2016.pdf&blobheadertype=language%3Des%26site%3DPortal>

- disposition&blobheadname2=cadena&blobheadvalue1=filename%3DCAL+VAC+INFANTIL+CM+2º+semestre+2016.pdf&blobheadvalue2=language%3Des%26site%3DPortalS
204. Servicio Madrileño de Salud. Actualización del documento 'Atención a la Salud Infantil en los Centros de Atención Primaria de la Comunidad de Madrid'. [Internet]. 2014. Available from: http://www.semap.org/docs/Documento_salud_infantil.pdf
205. García-Blanco L, Ciriza Barea E, Moreno-Gallarraga L, Martín-Clavo N. ¿Por qué la representatividad de la muestra no siempre es importante? *An Pediatr*. 2018;88(6):361–2.
206. Jiang L, Ng IHL, Hou Y, Li D, Tan LWL, Ho HJA, et al. Infectious disease transmission: survey of contacts between hospital-based healthcare workers and working adults from the general population. *J Hosp Infect*. 2018;98(4):404–11.
207. Kapel N, Campeotto F, Kalach N, Baldassare M, Butel M-JJ, Dupont C. Faecal calprotectin in term and preterm neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51(5):542–7.
208. van Elburg RM, Fetter WPF, Bunkers CM, Heymans HSA. Intestinal permeability in relation to birth weight and gestational and postnatal age. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed*. 2003;88(1):52–5.
209. Wagner CL, Taylor SN, Johnson D. Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008;34(2):191–204.
210. Anderson R, Dalzei J, Gopal P, Bassett S, Ellis A, Roy N. The Role of Intestinal Barrier Function in Early Life in the Development of Colitis. Vol. 1, Colitis. 2012. 3–30 p.
211. Lim CK, Dahle C, Elvin K, Andersson BA, Rönnelid J, Melén E, et al. Reversal of Immunoglobulin A Deficiency in Children. *J Clin Immunol*. 2014;35(1):87–91.

212. Comunidad de Madrid. Estadística del Movimiento Natural de la Población de la Comunidad de Madrid. Series anuales de Nacimientos. 2014 [Internet]. Instituto de Estadística de la Comunidad de Madrid. 2014. Available from: <http://www.madrid.org/iestadis/fijas/estructu/demograficas/mnp/imnp14nacimientos.htm>
213. Ministerio de Sanidad y Política Social. Gobierno de España. Maternidad Hospitalaria. Estándares y Recomendaciones. Informes, Estudios e Investigación 2009. Ministerio de Sanidad y Política Social 2009 p. 1–229.
214. INE. Nacimientos por tipo de parto, tiempo de gestación y grupo de edad de la madre. [Internet]. Instituto Nacional de Estadística. 2014 [cited 2017 Sep 30]. Available from: <http://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?path=/t20/e301/nacim/a2015/I0/&file=01011.px>
215. Stokholm J, Thorsen J, Chawes BL, Schjørring S, Krogfelt KA, Bønnelykke K, et al. Cesarean section changes neonatal gut colonization. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(3):881-889.e2.
216. Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: A systematic review. *BMC Gastroenterol*. 2016;16(1):1–12.
217. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(26):11971–5.
218. Laforest-Lapointe I, Arrieta M-C. Patterns of Early-Life Gut Microbial Colonization during Human Immune Development: An Ecological Perspective. *Front Immunol*. 2017;8:788.
219. Brandão HV, Vieira GO, Vieira TDO, Camargos PA, Teles CA se S, Guimarães AC,

- et al. Increased risk of allergic rhinitis among children delivered by cesarean section: a cross-sectional study nested in a birth cohort. *BMC Pediatr.* 2016;16(57):1–8.
220. Kolokotroni O, Middleton N, Gavatha M, Lamnisos D, Priftis KN. Asthma and atopy in children born by caesarean section : effect modification by family history of allergies – a population based cross-sectional study. *BMC Pediatr.* 2012;12(179):1–9.
 221. Zoppelli L, Güttel C, Bittrich HJ, Andrée C, Wirth S, Jenke A. Fecal calprotectin concentrations in premature infants have a lower limit and show postnatal and gestational age dependence. *Neonatology.* 2012;102(1):68–74.
 222. Underwood MA, Sohn K. The Microbiota of the Extremely Preterm Infant. *Clin Perinatol.* 2017;44(2):407–27.
 223. INE. Nacimientos por tipo de parto, peso del nacido y grupo de edad de la madre. [Internet]. Instituto Nacional de Estadística. 2015 [cited 2017 Sep 30]. Available from: <http://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?path=/t20/e301/nacim/a2015/I0/&file=01012.px>
 224. INE. Encuestas Nacional de Salud . Instituto Nacional de Estadística. [Internet]. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. [cited 2017 Oct 3]. Available from: <http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/%0A9>
 225. Díaz-Gómez M, Ruzafa-Martínez M, Ares S, Espiga I, De Alba C. Motivaciones y barreras percibidas por las mujeres españolas en relación a la lactancia materna. *Rev Esp Salud Pública.* 2016;90:1–18.
 226. Díaz Gómez M. Encuesta Nacional sobre Hábitos de Lactancia. *Glob Breastfeed Initiat* [Internet]. 2013;(Imlm). Available from: <http://www.aeped.es/sites/default/files/resumen-presentacion-encuestalm->

- julio2013_0.pdf.%5Cnhttp://www.aeped.es/sites/default/files/resumen-presentacion-encuestalm-julio2013_0.pdf
227. Taylor SN, Basile LA, Ebeling M, Wagner CL. Intestinal Permeability in Preterm Infants by Feeding Type: Mother's Milk Versus Formula. *Breastfeed Med.* 2009;4(1):11–5.
 228. Carrascosa A, Fernández J, Ferránez A, López-Sigero J, López D, Sánchez E. Estudios Españoles de Crecimiento 2010. *Rev Esp Endocrinol Pediatr.* 2011;2(Suppl):59–62.
 229. Furlong KR, Anderson LN, Kang H, Lebovic G, Parkin PC, Maguire JL, et al. BMI-for-Age and Weight-for-Length in Children 0 to 2 Years. *Pediatrics.* 2016;138(1):1–9.
 230. Lee H, Lee IS, Choue R. Obesity, inflammation and diet. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2013;16(3):143–52.
 231. Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications. *Arch Med Sci.* 2017;13(4):851–63.
 232. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders -. *Nature* [Internet]. 2006;444(December):860–7. Available from: [internal-pdf://0077281237/Inflammation and metabolic disorders - Hotamisligil, 2006.pdf](http://internal-pdf://0077281237/Inflammation%20and%20metabolic%20disorders%20-%20Hotamisligil,%202006.pdf)
 233. Rivera P, Martos-Moreno G, Barrios V, Suárez J, Pavón FJ, Chowen JA, et al. A novel approach to childhood obesity: circulating chemokines and growth factors as biomarkers of insulin resistance. *Pediatr Obes.* 2018;14(3):e12473.
 234. Baquedano E, Ruiz-Lopez AM, Sustarsic EG, Herpy J, List EO, Chowen JA, et al. The absence of GH signaling affects the susceptibility to high-fat diet-induced hypothalamic inflammation in male mice. *Endocrinology.* 2014;155(12):4856–67.
 235. Martos-Moreno GÁ, Sackmann-Sala L, Barrios V, Berrymann DE, Okada S, Argente J, et al. Proteomic analysis allows for early detection of potential markers

- of metabolic impairment in very young obese children. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2014;2014(9):1–11.
236. Hodin CM, Verdam FJ, Grootjans J, Rensen SS, Verheyen FK, Dejong CHC, et al. Reduced Paneth cell antimicrobial protein levels correlate with activation of the unfolded protein response in the gut of obese individuals. *J Pathol*. 2011;225(2):276–84.
 237. Guo X, Li J, Tang R, Zhang G, Zeng H, Wood RJ, et al. High Fat Diet Alters Gut Microbiota and the Expression of Paneth Cell-Antimicrobial Peptides Preceding Changes of Circulating Inflammatory Cytokines. *Mediators Inflamm*. 2017;2017.
 238. Sun L, Ma L, Ma Y, Zhang F, Zhao C, Nie Y. Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives. *Protein Cell*. 2018;9(5):397–403.
 239. Verdam FJ, Fuentes S, de Jonge C d, Zoetendal EG, Erbil R, Greve JW, et al. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity*. 2013;21(12):1–26.
 240. Gøbel RJ, Larsen N, Jakobsen M, Mølgaard C, Michaelsen KF. Probiotics to Adolescents With Obesity : Effects on Inflammation and Metabolic Syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;55(6):673–8.
 241. Ajani UA, Ford ES, Mokdad AH. Dietary fiber and C-reactive protein: findings from national health and nutrition examination survey data. *J Nutr*. 2004;134(5):1181–5.
 242. Monda V, Villano I, Messina A, Valenzano A, Esposito T, Moscatelli F, et al. Exercise modifies the gut microbiota with positive health effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1–8.
 243. Martínez Suárez V, Moreno Villares JM, Dalmau Serra J. Recomendaciones de ingesta de calcio y vitamina D: posicionamiento del Comité de Nutrición de la

- Asociación Española de Pediatría. *An Pediatr*. 2012;77(1):57.e1-57.e8.
244. Tabbers MM, DiLorenzo C, Berger MY, Faure C, Langendam MW, Nurko S, et al. Evaluation and Treatment of Functional Constipation in Infants and Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;58(2):258–74.
245. Gorkom BAP Van, Karrenbeld A, Sluis T Van Der, Zwart N, Vries EGE De, Kleibeuker JH. Apoptosis induction by sennoside laxatives in man ; escape from a protective mechanism during chronic sennoside use ? *J Pathol*. 2001;194:493–9.
246. Ministerio de Educación y Formación Profesional. Etapas educativas en España. [Internet]. Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. 2017 [cited 2017 Oct 14]. Available from: <http://www.mecd.gob.es/educacion-mecd/areas-educacion/estudiantes/portada.html>
247. Tojo R, Suárez A, Clemente MG, De Los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M, et al. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(41):15163–76.
248. Allan Walker W. Intestinal Colonization and Programming of the Intestinal Immune Response. NIH Public Access. *J Clin Gastroenterol*. 2014;48:8–11.
249. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol*. 2014;16(7):1024–33.
250. Khanna S, Raffals LE. The Microbiome in Crohn’s Disease: Role in Pathogenesis and Role of Microbiome Replacement Therapies. *Gastroenterol Clin North Am* [Internet]. 2017;46(3):481–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gtc.2017.05.004>
251. Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BMR, Spiller RC, Vanner S, et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: A Rome foundation report. *Gut*. 2013;62(1):159–76.

252. Grochowska M, Laskus T, Radkowski M. Gut Microbiota in Neurological Disorders. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2019;October:1–9.
253. Nallu A, Sharma S, Ramezani A, Muralidharan J, Raj D. Gut Microbiome in CKD : challenges and opportunities. *Transl Res*. 2018;179:24–37.
254. Rogawski ET, Bartelt LA, Platts-Mills JA, Seidman JC, Samie A, Havt A, et al. Determinants and impact of Giardia infection in the first 2 years of life in the MAL-ED birth cohort. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2017;6(2):153–60.
255. Pijnacker R, Mughini-Gras L, Heusinkveld M, Roelfsema J, van Pelt W, Kortbeek T. Different risk factors for infection with Giardia lamblia assemblages A and B in children attending day-care centres. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35:2005–13.
256. Aparicio Rodrigo M, Díaz Cirujano AI. Parasitosis intestinales. Guía-ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico. Guía ABE [Internet]. 2013;1.1:1–11. Available from: www.guia-abe.es
257. Waldram A, Vivancos R, Hartley C, Lamden K. Prevalence of Giardia infection in households of Giardia cases and risk factors for household transmission. *BMC Infect Dis*. 2017;17(486):1–7.
258. Mateo M, Mateo M, Montoya A, Bailo B, Saugar JM, Aguilera M, et al. Detection and molecular characterization of Giardia duodenalis in children attending day care centers in Majadahonda, Madrid, Central Spain. *Medicine (Baltimore)*. 2014;93(15):1–6.
259. Bøås H, Tapia G, Sødahl J a, Rasmussen T, Rønningen KS. Enterobius vermicularis and risk factors in healthy Norwegian children. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;13(9):927–30.
260. Peña RM, Conejo PR. Gastroenteritis aguda. *Pediatr Integr*. 2015;19(1):51–7.

Bibliografía

261. Gonzalez MJ, Alonso M. Incidencia y sensibilidad de *Campylobacter jejuni* en pacientes pediátricos: implicación en bacteriemia. *Rev Esp Quim.* 2013;26(2):92–6.
262. Bogotá DEUNALDE, Bayona M, Celemín J, Medicina F De, Ciencias U De, Bogotá ATOF. Prevalence of *Salmonella* spp ., in children from kindergartens in a town of Bogotá, Colombia. *Rev Venez Salud Pública.* 2014;2(1):9–13.
263. Riechmann ER, Cal IW De, Cilleruelo M, Rey CC. Gastroenteritis aguda nosocomial e infección asintomática por rotavirus y astrovirus en niños hospitalizados. *An Pediatría* [Internet]. 2004;60(4):337–43. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1695-4033\(04\)78280-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1695-4033(04)78280-6)